HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	時間分解蛍光法によるLB膜分子の動的構造に関する基礎研究
Author(s)	木村, 尚仁
Citation	
Issue Date	1992-03-25
DOI	
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/49766
Right	
Type	theses (doctoral)
Additional Information	
File Information	000000249602.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

時間分解螢光法による
ＬＢ膜分子の動的構造に関する
基礎研究

木村尚仁

1

博士論文

時間分解蛍光法による
ＬＢ膜分子の動的構造に関する
基礎研究

北海道大学大学院　工学研究科
博士後期課程　電子工学専攻
固体電子工学講座
木村　尚仁

【目次】

第１章　序論 ……………………………………………………1
参考文献 ……………………………………………………………5

第２章　時間分解蛍光偏光解消法の原理 ……………………………7
２．１　偏光解消の原理 …………………………………………7
２．２　巨視的等方系における蛍光の偏光性の指標 ……………10
２．３　平面配向系における座標系の設定 ………………………12
２．４　平面配向系における偏光性の指標 ………………………14
２．５　偏光率の基本的性質 ………………………………………16
参考文献 ……………………………………………………………19

第３章　モデルを用いた偏光解消解析法 ……………………………20
３．１　蛍光強度比を用いた解析法 ………………………………20
３．２　偏光率を用いた解析法－揺動角、配向角 ………………26
３．３　偏光率を用いた解析法－揺動拡散定数 …………………29
３．４　偏光率の時間変化の計算 …………………………………31
参考文献 ……………………………………………………………38

第４章　時間分解蛍光偏光解消の測定法 ……………………………39
４．１　時間相関単一光子計数法 …………………………………39
４．２　光源 …………………………………………………………43
４．３　光学系 ………………………………………………………44
４．４　回路系 ………………………………………………………45
４．５　偏光率を求めるための蛍光偏光成分の測定 ……………47
参考文献 ……………………………………………………………52

第５章　ＬＢ法による製膜 ……………………………………53
５．１　ＬＢ膜製膜の原理 ……………………………………53
５．２　製膜に使用した物質 ……………………………………57
５．３　偏光解消測定用ＬＢ膜試料の作製 ……………………………………57
参考文献 ……………………………………60

第６章　時間分解蛍光偏光解消法によるＬＢ膜の評価および考察 ……………61
６．１　偏光率の測定 ……………………………………61
６．２　ＬＢ膜の累積条件（累積時の表面圧）の影響 ……………………67
６．３　他の偏光性の指標を用いた表現との比較 ……………………72
参考文献 ……………………………………75

第７章　結論 ……………………………………76

謝辞 ……………………………………78

第1章 序論

かつて有機物と無機物の間には本質的な差異が存するとされていた。有機物は生命活動にかかわることによってのみ生成されるために、その中にはいわば、「生命力」あるいは「生気」の様なものが宿っているはずだと考えられていたからである。しかし１８２８年、フリードリッヒ・ヴェーラーが有機物である尿素を無機物であるシアン化アンモニウムから人工的に合成することに成功して以来、この様な生気論的な考え方は否定されるに至った(1)。両者は物理的にも化学的にも区別されるべきものではなく、また実際にそれらに関する研究は、理論的にも実験的にも共通の基盤の上で行われている。

しかし、現在に至るまで微妙に意味合いを変えつつも、有機物と無機物の区別は無くなってはおらず、通常それらは異なる範疇に分類されている。これは、有機物は無機物に見られない何らかの物理的、化学的特徴を持つ場合があることが一般に認識されているからであると考えられる（もちろん生気論的な事柄とは無関係である）。例えば酵素として働くタンパク質は一般に一個ないし数個だけで高度の機能を有し、その効率はかなり高いことが知られている(2)。それと同じ機能を無機物を用いて再現することはかなり困難なことであろう。

この様な有機化合物あるいはその背後にある生体内のシステム特有の物理的、化学的性質を見極め、積極的に利用することが、最近の分子素子、バイオ素子に関する研究・開発の目的の一つであると云える。この研究に期待が寄せられる様になってきた背景には、より集積度の高いデバイス、システムを目指すエレクトロニクス分野からの要請がある。２０００年には１ＧビットのＤＲＡＭの開発が予想されている現在、更なる高機能、高速度をより小さな素子で実現するための方法が検討されている。その一つは光や紫外線による半導体微細加工技術に替わる、Ｘ線レジストやレジストレス加工技術の開発、もう一つが分子素子、バイオ素子であって、これは次のように分類される(3)。

（１）生物化学プロセスを利用した分子構築によってつくられるもの

（２）生体物質を部分的あるいは全体的に利用してつくられるもの

（３）脳のアーキテクチャーに基づき構成されるもの

有機分子を素子とするためには、それを薄膜として構築する必要がある。現在、有機薄膜を作製する方法としては、以下の様なものがある[4]。ウエットプロセスによるものとしては、

（１）Ｌａｎｇｍｕｉｒ－Ｂｌｏｄｇｅｔｔ（ＬＢ）法

（２）回転塗布法

（３）キャスト法

（４）水上延展法

ドライプロセスによるものとしては、

（５）真空蒸着法

（６）ＭＢＥ法

（７）イオンプレーティング法

（８）スパッタリング法

（９）プラズマ重合法

がある。この内、分子配列制御性に優れ、常温・常圧で製膜が可能であり、また装置も比較的簡単であることから、もっとも注目されているのがＬＢ法であり、この方法によって作られた膜をＬＢ膜と云う。

ＬＢ膜、特にその構造に関しては一般に以下のような研究がなされている。

（１）Ｘ線回折[5,10]、電子線回折[11,12]等による分子配列の結晶的構造に関する研究。

（２）電子顕微鏡[7,13-16]、蛍光顕微鏡[17,18]等によるモルフォロジー（ドメイン構造、欠陥等）に関する研究。

（３）赤外・可視分光[19-21]等による分子の会合状態、配向に関する研究。

他に最近はＳＴＭ（走査型トンネル顕微鏡）による研究[16,22]も数多くなされている。これらに共通しているのは、数時間、数日単位以上の経時変化等を除くと、膜を構成している分子、およびそれらの集合体が静的であるとみなして、あるいは時間的に平均化された状態として観測されていると云うことである。

しかし、室温環境下では程度の差こそあれ分子は本来動的であり、揺れ動いているはずである。そして例えば生物体内においては、生体膜中の分子の動きが膜構造の安定化、機能の発現に大きく関与していると考えられている[23,24]。分子

素子・バイオ素子がこのような生体機能をモデルとする以上、分子運動が素子の機能に重大な影響を与えるであろうことが予想される。また、この揺動運動を調べることにより、分子間の相互作用力を知ることが出来る。そこで分子種の選択、作製条件等と分子間相互作用の関係を系統立てて理解することにより、分子膜を作製する際の分子の凝集、組織化を制御する方法を開発することが可能であると考えられる。

本研究では、このゆらぎ運動こそが今後の機能性有機分子素子、バイオ素子を開発する上での鍵であるとの見解に立ち、有機分子薄膜における微視的動的性質を基本的に明らかにし、膜物性との関係を理解することを目指し、そのための測定・解析法に関する基礎研究を行った。

分子の動的状態を測定する一般的な方法としては、赤外分光法、ラマン散乱法があるが、これらが直接的に対象としているのは分子内での原子、あるいは原子団の相対運動である。また最近、誘導電流を用いた水面上単分子膜の圧縮過程の測定、観察研究も行われているが[25]、これは膜の比較的マクロなレベルに関するものであり、ここで問題にしようとしている「揺動運動」とは異なるものである。

脂質分子の揺動運動は数十オングストロームのサイズの中で、かつ極めて速いナノ秒の時間領域で起こる現象であるため、これを観測する手段としては光、特に蛍光を利用したものが必要となる。そこで本研究においては測定方法として「時間分解蛍光偏光解消法」を用いた。この測定法は微小な時間領域における分子の動きを捉える上で極めて優れた方法であり、従来は主として溶媒中の分子の回転拡散運動、あるいは生体膜、ベシクル中の脂質、タンパク質分子の揺動運動を観測するために用いられて来た[26-29]。これらの測定対象は系全体として等方的であるが故に解析法が比較的簡単であることから、理論的にも充分研究され、精密化されている。一方、ＬＢ膜、液晶のように平面的に配向した、非等方的な系を対象とした研究もなされているが[30-34]、その解析法の主要部分は前述の等方的な系からの類推、部分的修正によるものである。本研究では、配向系の測定・解析を行うためには根本的にそれらを対象とする方法・理論が必要であると考え、新たな理論展開を行った。

本論文は全７章から構成されており、以下に第２章以降の概要を示す。

第２章では、時間分解偏光解消の原理、理論について述べ、さらにＬＢ膜等の平面配向系からの蛍光の偏光性を表すための新たな指標として「偏光率」を導入し、その基本的性質について記す。

第３章では、モデルを用いた、ＬＢ膜等平面配向系の時間分解偏光解消法による解析法、および偏光率の時間変化の計算法について述べる。

第４章では、時間相関単一光子計数法を用いた時間分解蛍光偏光解消測定の原理、および装置について述べる。

第５章では、ＬＢ膜の作製法の原理、装置について述べる。

第６章では、蛍光プローブを挿入したステアリン酸ＬＢ膜に関する、時間分解蛍光偏光解消法による、測定・解析結果について述べる。

第７章では、本研究の総括をして結論とする。

【参考文献】

(1) F．クリック（玉木英彦訳）、「分子と人間」、みすず書房、1970。

(2) 相澤益男、「バイオ素子」（雀部博之編）、丸善、1991、pp.1-26。

(3) 雀部博之、「バイオ素子」（雀部博之編）、丸善、1991、pp.27-66。

(4) 稲岡紀子生、八瀬清志、「真空中で分子を並べる－有機蒸着膜」、共立出版、1989。

(5) M.Prakash, P.Dutta, J.B.Ketterson and B.M.Abraham, Chem. Phys. Letters, **111**(1984)395.

(6) M.Prakash, J.B.Ketterson and P.Dutta, Thin Solid Films, **134**(1985)1.

(7) M.Allain, J.J.Benattar, F.Rieutord and P. Robin, Europhys.Lett., **3**(1987)309.

(8) K.Mizushima, T.Nakayama and M.Azuma, Jpn.J.Appl.Phys., **26**(1987)772.

(9) K.Mizushima, S.Egusa and M.Azuma, Jpn.J.Appl.Phys., **27**(1988)715.

(10) M.R.Buhaeko, M.J.Grundy, R.M.Richarson and S.J.Roser, Thin Solid Films, **159**(1988)253.

(11) J.F.Stephens and C.Tuck-Lee, J.Appl.Crystallogr., **2**(1969)1.

(12) I.R.Peterson and G.J.Russell, Philos.Mag., **A49**(1984)463.

(13) R.D.Neuman, S.Fereshtehkhou and R.Ovalle, J.Colloid Interface Sci., **101**(1984)309.

(14) A.Barraud, J.Leloup, P.Maire and A.Ruaudel-Teixier, Thin Solid Films, **133**(1985)133.

(15) K.Itoh, T.Yokota and A.Fujishima, Thin Solid Films, **144**(1986)L115.

(16) H.G.Braun, H.Fuchs and W.Schreep, Thin Solid Films, **159**(1988)301.

(17) M.Lösche, J.Rabe, A.Fischer, B.U.Rucha, W.Knoll and H.Möhwald, Thin Solid Films, **117**(1984)269.

(18) M.Lösche, C.Helm, H.D.Mattes and H.Möhwald, Thin Solid Films, **133**(1985)51.

(19) F.Kimura, J.Umemura and T.Takenaka, Langmuir, **2**(1986)96.

(20) T. Kamata, A. Kato, J. Umemura and T. Takenaka, Langmuir, 3(1987)1150.

(21) T. I. Lotta, L. J. Laakkonen, J. A. Virtanen and P. K. J. Kinnunen, Chem. Phys. Lipids, 46(1988)1.

(22) R. Kuroda, E. Kishi, A. Yamano, K. Hatanaka H. Matsuda, K. Eguchi and T. Nakagiri, J. Vac. Sci Technol., B9(1991)1180.

(23) J．B．フィネアン、R．コールマン、R．H．ミッチェル（佐藤了、日野幸信訳）、「生体膜と細胞活動」、培風館、1987。

(24) 大西俊一、「生体膜の動的構造」、東京大学出版会、1980。

(25) 岩本正光、他、信学技報、OME90-16。

(26) K. Kinosita, Jr., S. Kawaro and A. Ikegami, Biophys. J., 20(1977)289.

(27) T. Araiso, Y. Shindo, J. Nitta, Y, Kikuchi, Y. Kakiuchi and T. Koyama, Biorheorogy, 23(1986)467.

(28) T. Araiso and T. Koyama, Chem. Phys. Lipids, 50(1989)105.

(29) J. R. Lakowicz, "Pricpiples of fluorescence spectroscopy," Plenum, New York, pp. 155-181.

(30) L. L. Chapoy and D. B. DuPré, J. Chem. Phys., 70(1978)2550.

(31) A. Szabo, J. Chem. Phys., 72(1980)4260.

(32) J. D. LeGrange, H. E. Riegler and W. P. Zurawsky, Thin Solid Films, 159 (1988)101.

(33) J. J. Fisz, Chem. Phys., 132(1989)303.

(34) J. D. LeGendre and H. Riegler, J. Chem. Phys., 90(1988)3838.

(35) 入山啓治、「ＬＢ膜の分子デザイン」、共立出版、1988。

第2章　時間分解蛍光偏光解消法の原理

2．1　偏光解消の原理[1, 2]

蛍光分子が完全にランダムに分散している溶液、あるいは蛍光分子を挿入したベシクル、生体膜の懸濁液を考える（Fig. 2.1）。これに鉛直方向に偏光した光を入射すると、分子の固有の吸収双極子と、励起光の偏光方向との間の角度によって定まる確率、

$$p_{ex} \propto (\boldsymbol{\varepsilon} \cdot \boldsymbol{\mu}_a)^2 = \cos^2\alpha \qquad (2.1)$$

に従って分子が励起される。ここで$\boldsymbol{\varepsilon}$は励起光の偏光方向の単位ベクトル、$\boldsymbol{\mu}_a$は吸収双極子方向の単位ベクトル、αはその両者がなす角度を表す。すなわち、$\boldsymbol{\varepsilon}$に近い角度にある分子ほど選択的に励起されることになり、この現象を光選択励起と呼ぶ。

ところが、この励起された分子から発せられる蛍光の偏光成分を測定すると、(2.1)で見積もられたものより偏光の度合いが減少することがある。この現象は「偏光解消」と呼ばれ、次の三つの原因が考えられる。

（１）吸収双極子と発光双極子の方位がずれているため、分子内緩和が起こることによる。

（２）分子の回転ブラウン運動による。

（３）分子間の励起エネルギー移動による。

この内（２）は分子運動に直接関係を持つので、これに関して詳しく検討してみる。

励起された分子は、その後蛍光を発して基底状態に戻っていくわけであるが（Fig. 2.2）、蛍光を$\boldsymbol{\varepsilon}$と平行な成分（$I_{/\!/}(t)$）と垂直な成分（$I_{\perp}(t)$）にわけて観測すると、$\boldsymbol{\mu}_a$と$\boldsymbol{\mu}_e$が大きく異ならない限り、励起直後は励起された分子の発光双極子は$\boldsymbol{\varepsilon}$に近く分布しているため $I_{/\!/}(t)$ は $I_{\perp}(t)$ より大きな値をとる。しかしその後、分子が回転ブラウン運動によって揺れ動き、その方向がずれてゆく

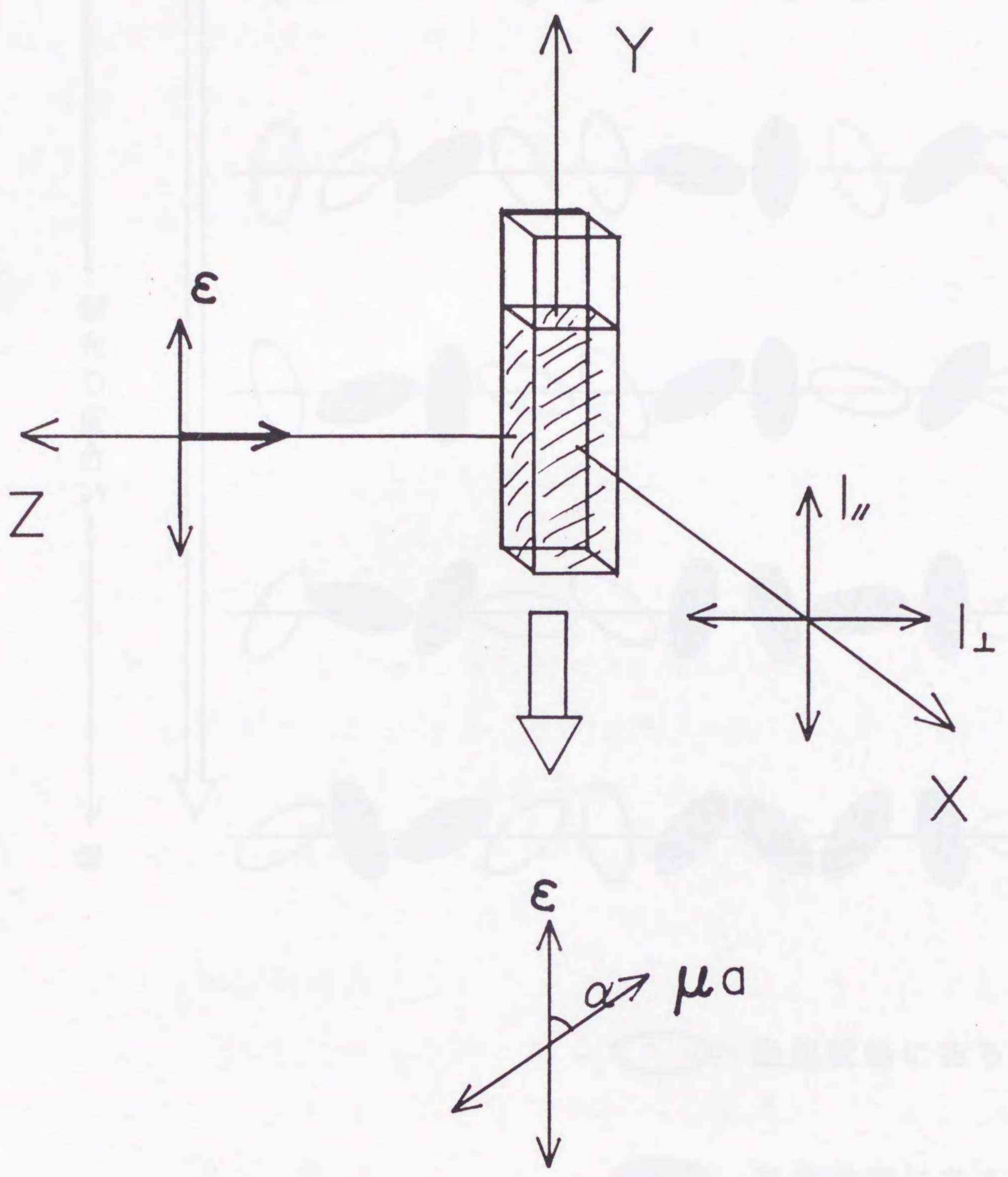


Fig. 2.1 蛍光偏光の測定

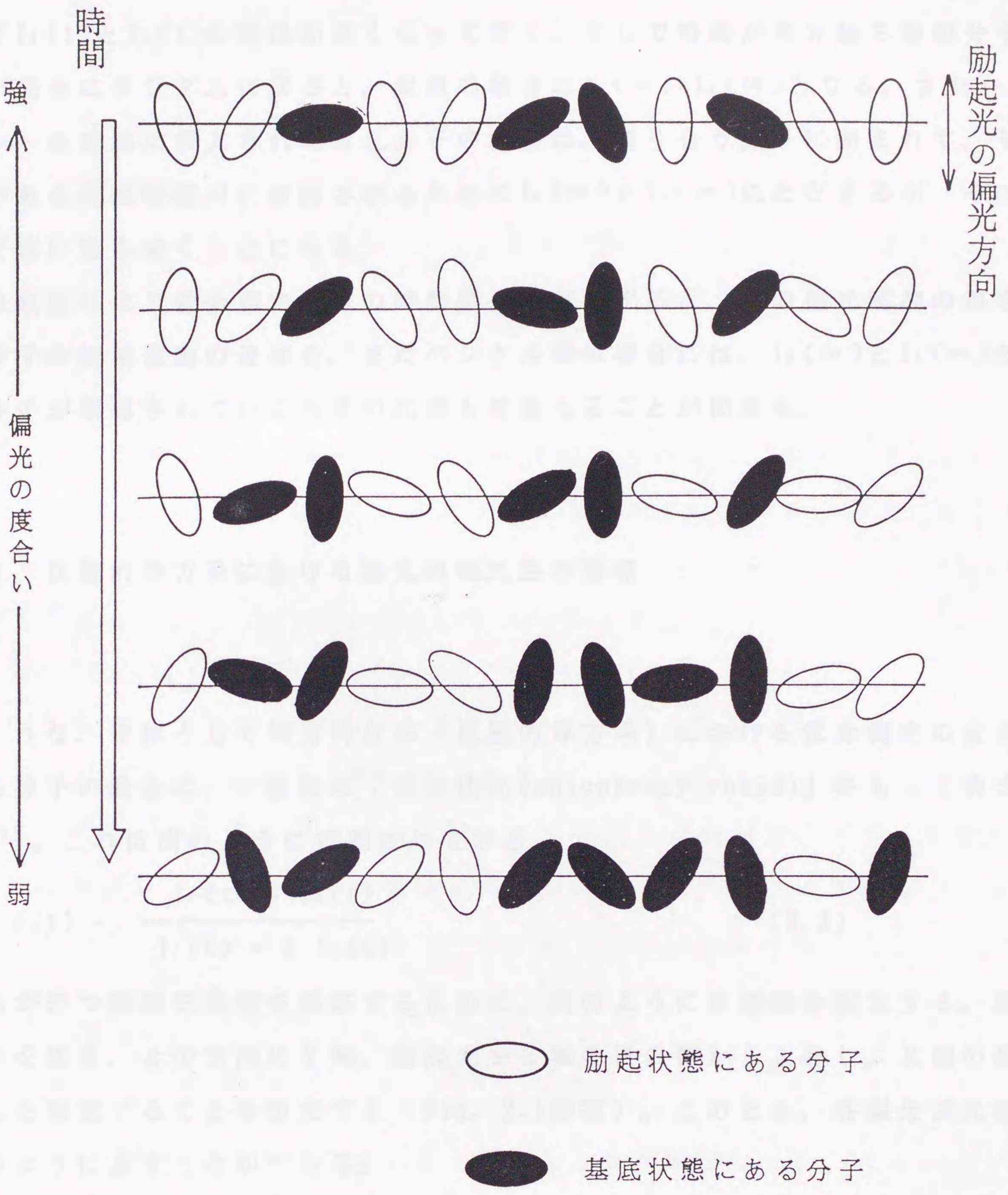


Fig. 2.2
選択励起及び、偏光解消の概念

につれて$I_{/\!/}(t)$と$I_{\perp}(t)$の差は小さくなって行く。そして時間が充分経ち励起分子の方向が完全にランダムに戻ると、溶液の場合は$I_{/\!/}(\infty)=I_{\perp}(\infty)$となる。また一方、ベシクル、生体膜に挿入された蛍光分子の場合は、隣り合う分子に囲まれて、その方向がある角度範囲内に束縛されるために$I_{/\!/}(\infty)>I_{\perp}(\infty)$にとどまるが、その差は一定値に落ち着くことになる。

以上の原理により蛍光偏光成分の時間変化を測定すると、その偏光解消の速さから、分子の揺動運動の速度を、またベシクル等の場合には、$I_{/\!/}(\infty)$と$I_{\perp}(\infty)$の差から分子が束縛されている角度の範囲も見積もることが出来る。

2．2　巨視的等方系における蛍光の偏光性の指標

このような、全体として等方的な系（巨視的等方系）における蛍光偏光の変化、すなわち分子の動きは、一般的に「異方性比(anisotropy ratio)」をもって表される[1-3]。これは次のように定義されている。

$$r(t) = \frac{I_{/\!/}(t) - I_{\perp}(t)}{I_{/\!/}(t) + 2\, I_{\perp}(t)} \qquad (2.2)$$

異方性比が持つ物理的意味を考察するために、次のように座標軸を設定する。原点に試料を置き、$\boldsymbol{\varepsilon}$の方向にY軸、励起光をZ軸の正の側から入射し、X軸の側から蛍光を観測することを想定する（Fig. 2.1参照）。このとき、各偏光蛍光強度は次のように表すことができる。

$$I_{/\!/}(t) = I_Y(t) = I_T(t)\int d\boldsymbol{\mu}_e\, n(\boldsymbol{\mu}_e;t)\,(\boldsymbol{\mu}_e\cdot\hat{Y})^2 \qquad (2.3)$$

$$I_{\perp}(t) = I_Z(t) = I_T(t)\int d\boldsymbol{\mu}_e\, n(\boldsymbol{\mu}_e;t)\,(\boldsymbol{\mu}_e\cdot\hat{Z})^2 \qquad (2.4)$$

$$= I_X(t) = I_T(t)\int d\boldsymbol{\mu}_e\, n(\boldsymbol{\mu}_e;t)\,(\boldsymbol{\mu}_e\cdot\hat{X})^2 \qquad (2.5)$$

ここで$I_T(t)$は蛍光寿命に関する項を含むトータルの蛍光強度、$\boldsymbol{\mu}_e$は励起分子の発光双極子と平行な単位ベクトルを示す。これをY軸を基準とする極角θ、Z軸を基準とする方位角ϕで表すこととすると、式中の積分は

$$\int d\boldsymbol{\mu}_e = \int_0^{\pi} d\theta \int_0^{2\pi} \sin\theta\, d\phi \qquad (2.6)$$

を意味している。また、$n(\boldsymbol{\mu}_e;t)$は時刻tにおける発光双極子の配向確率分布関数であり、(2.1)に従って与えられる。(2.3)における$(\boldsymbol{\mu}_e\cdot\hat{Y})^2$は$\boldsymbol{\mu}_e$とY軸とのなす角度のコサインの2乗を意味し、$\boldsymbol{\mu}_e$の方向を向く励起分子から放出された光子がY軸方向に偏光しているものとして観測される確率を示す。これは(2.4)、(2.5)におけるZ、Xについても同様である。なお、記号「ˆ」はその方向を向く単位ベクトルを表す。

さて、ここで対象としている全体として等方的な系の場合、励起分子の分布$n(\boldsymbol{\mu}_e;t)$は励起軸（Y軸）の周りの方位角方向には一様になるため、角度に関してはθのみの関数となる。このことが、(2.4)、(2.5)において$I_X(t)=I_Z(t)$となっている根拠である。従って(2.2)における異方性比の分母は、

$$I_{/\!/}(t)+2I_{\perp}(t) = I_X(t)+I_Y(t)+I_Z(t) = I_T(t) \qquad (2.7)$$

つまり全蛍光強度を意味していることが分かる。この系においては励起軸方向（Y軸）とそれに垂直な方向（Z軸あるいはX軸）の二つのみが特異的な方向となっているので、それら二方向の蛍光偏光成分の差を全蛍光強度で割り、蛍光寿命による項を相殺した量である異方性比r（t）によって、蛍光偏光の度合いを充分適切に表すことが出来る。実際異方性比に関して理論計算を進めると、

$$r(t) = r_0 \langle P_2(\cos\theta)\rangle_t \qquad (2.8)$$

$$r_0 = \frac{2}{5} P_2(\cos\omega) \qquad (2.9)$$

となり、明確な物理的意味を持つ量となっていることが理解できる。但しここで、ωは$\boldsymbol{\mu}_a$と$\boldsymbol{\mu}_e$のなす角度を示す。また、$P_2(x)$は2次のルジャンドル関数

$$P_2(x) = \frac{3x^2 - 1}{2} \qquad (2.10)$$

である。$\langle\cdots\rangle_t$は、$f(\boldsymbol{\mu})$を任意の関数とするとき、

$$\langle f(\boldsymbol{\mu})\rangle_t = \int d\boldsymbol{\mu}\ n(\boldsymbol{\mu};t)\ f(\boldsymbol{\mu}) \qquad (2.11)$$

すなわち、時刻tにおける全励起蛍光分子に関する平均値を表す。

2. 3 平面配向系における座標系の設定

ＬＢ膜、液晶の様に全体として配向した系における偏光解消を議論するために、以下の三つの座標系を定義する。(X,Y,Z)は実験室系に固定された座標であり（Fig. 2.3(a))、試料は原点に置かれ、鉛直方向をＹ軸、励起光の入射方向をＺ軸、蛍光を測定する方向をＸ軸とする。(X_s,Y_s,Z_s)は試料平面（ＬＢ膜の場合には基板）上に固定された座標であり（Fig. 2.3(a))、基板法線方向をZ_s軸、平面の縦方向をY_sとする。(x,y,z)は分子の配向を表すための座標であり（Fig. 2.3(b))、平均して一軸方向に配向している場合、その軸方向をｚ軸とする。また、ｚ軸を基準とする極角をθ、ｘ軸を基準とする方位角をϕで表すこととする。これら三つの座標系の関係は以下の行列方程式で表すことが出来る。

$$x = DX_s = DGX = RX \qquad (2.12)$$

ここで、

$$x = [x,y,z]^T,\ X_s = [X_s,Y_s,Z_s]^T,\ X = [X,Y,Z]^T \qquad (2.13)$$

は、それぞれ各座標系で表した座標ベクトル表示である。また、

$$G = \begin{bmatrix} \cos\xi\cos\zeta & \sin\zeta & -\sin\xi\cos\zeta \\ -\cos\xi\sin\zeta & \cos\zeta & \sin\xi\sin\zeta \\ \sin\xi & 0 & \cos\xi \end{bmatrix} \qquad (2.14)$$

は実験室系における座標を基板上の座標に変換する行列であり、ξは鉛直軸（Ｙ軸）に対する基板の回転角、ζは基板法線に対する回転角を表す。

$$D = \begin{bmatrix} \cos\gamma & \sin\gamma & 0 \\ -\cos\delta\sin\gamma & \cos\delta\cos\gamma & \sin\delta \\ \sin\delta\sin\gamma & -\sin\delta\sin\gamma & \cos\delta \end{bmatrix} \qquad (2.15)$$

は基板上の座標系を分子配向を表すための座標系に変換する行列である。

$$R = DG \qquad (2.16)$$

は実験室系の座標を分子配向を表すための座標系に変換する行列である。

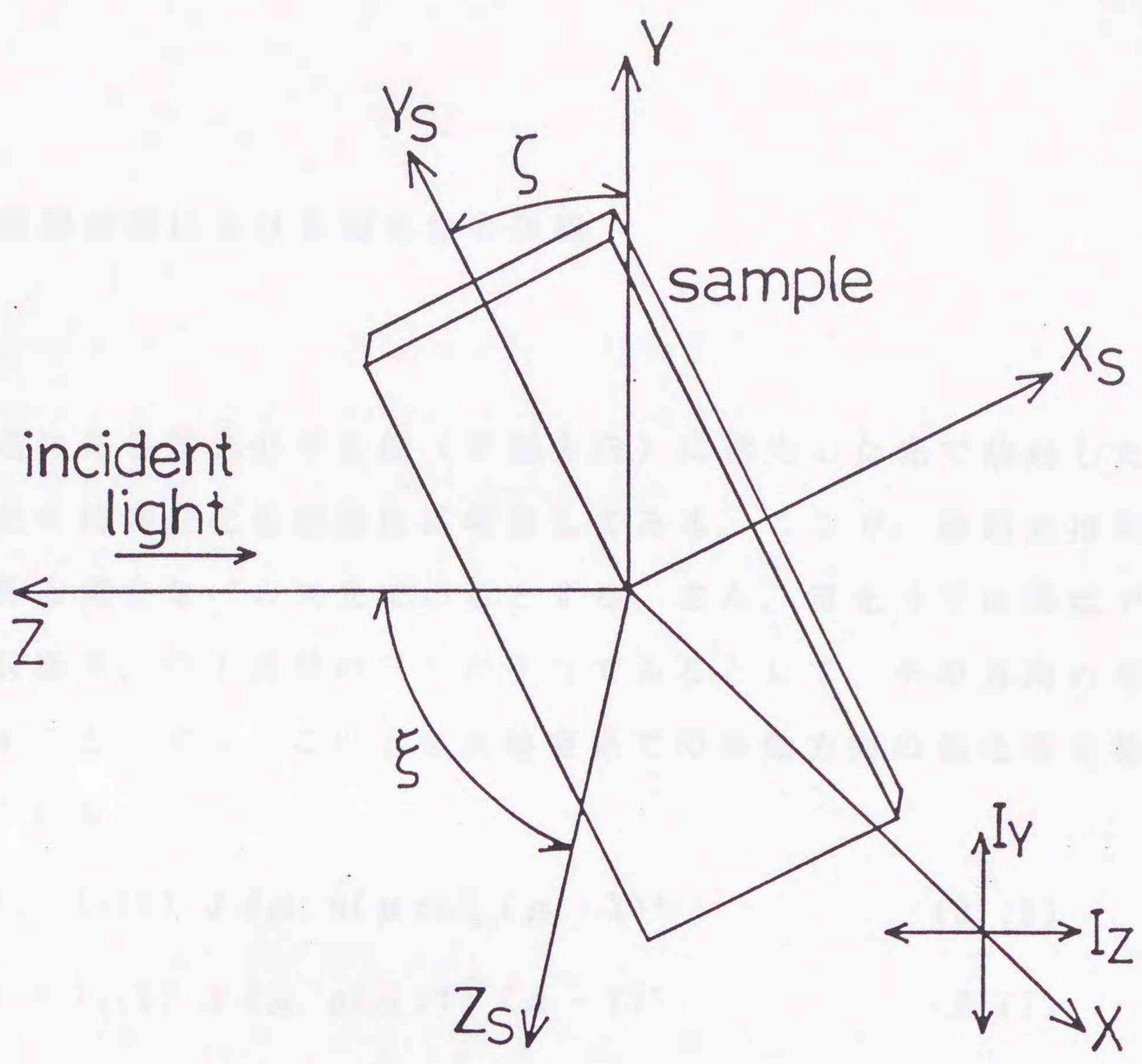


Fig.　2．3（a）　実験室系に固定された座標（X，Y，Z）
および　基板に固定された座標（X_s，Y_s，Z_s）

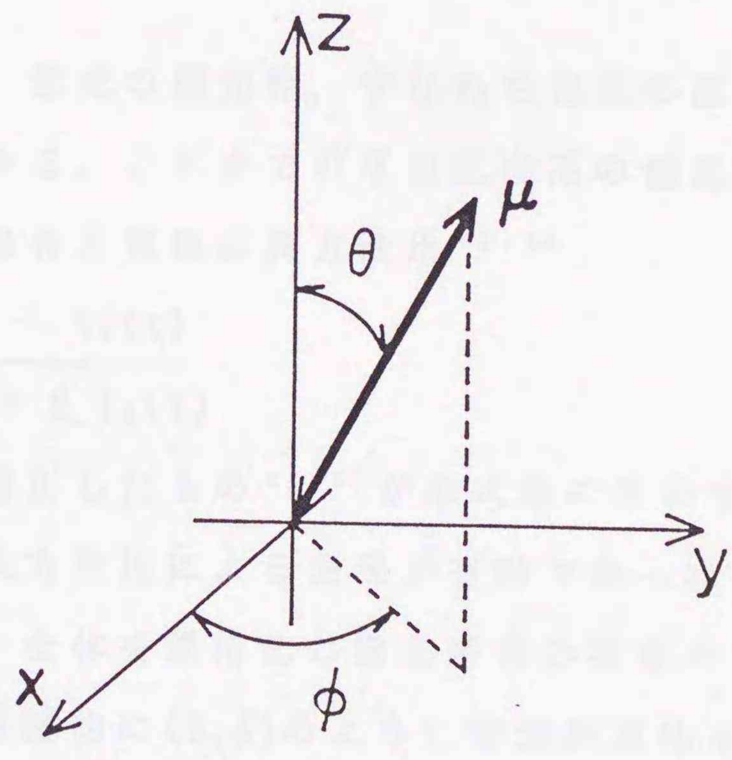


Fig.　2．3（b）　分子配向を表すための座標（x，y，z）
または（θ，φ）

2．4　平面配向系における偏光性の指標

このような系にある蛍光分子を縦（Y軸方向）に偏光した光で励起したときの、放出される蛍光の時間変化を理論的に考察してみる。ここで、励起光は時間軸上でδ関数的である完全なパルス光であるとする。また、蛍光分子は棒状で、吸収双極子、発光双極子、分子長軸の三つが平行であるとして、その方向の単位ベクトルを$\boldsymbol{\mu}$で表すこととする。このとき実験室系での各軸方向の偏光蛍光強度は次のように与えられる。

$$I_X(t) = I_T(t) \int d\boldsymbol{\mu}\ n(\boldsymbol{\mu};t)\ (\boldsymbol{\mu}\cdot\hat{X})^2 \tag{2.16}$$

$$I_Y(t) = I_T(t) \int d\boldsymbol{\mu}\ n(\boldsymbol{\mu};t)\ (\boldsymbol{\mu}\cdot\hat{Y})^2 \tag{2.17}$$

$$I_Z(t) = I_T(t) \int d\boldsymbol{\mu}\ n(\boldsymbol{\mu};t)\ (\boldsymbol{\mu}\cdot\hat{Z})^2 \tag{2.18}$$

$I_T(t)$は蛍光寿命の項を含む全蛍光強度、$n(\boldsymbol{\mu};t)=n(\theta,\phi;t)$は時刻$t$における励起分子の配向分布関数を示す。「＾」はその方向を向く単位ベクトルを示す。従って例えば$\boldsymbol{\mu}$は

$$\boldsymbol{\mu} = \hat{x}\ \sin\theta\cos\phi\ +\ \hat{y}\ \sin\theta\sin\phi\ +\ \hat{z}\ \cos\theta \tag{2.19}$$

と表すことができる。

ここで問題となるのは、蛍光の偏光性、すなわち偏光の度合いをどのような指標で表すかと云うことである。これまでの平面配向系の偏光解消研究では通常、全体として等方的な系の場合と同様に異方性比[3-5]

$$r(t) = \frac{I_Y(t)\ -\ I_Z(t)}{I_Y(t)\ +\ 2\ I_Z(t)} \tag{2.20}$$

あるいはそれを部分的に補正したもの[6-8]が形式的にそのまま用いられていた。全体として等方的な系で異方性比による表現が有効であったのは、分母が(2.7)のように全蛍光強度となり、全体を規格化し蛍光寿命の項をキャンセルする役割を持つことにより、$r(t)$が最終的に(2.8)のように物理的意味を持つ量となっているからである。ところが平面配向系の場合、$I_X(t)$、$I_Y(t)$、$I_Z(t)$は一般的に皆異なった値をとる。従って$I_Y(t)+2I_Z(t)\neq I_T(t)$であるから、(2.20)は

$$r(t) = \frac{\langle(\boldsymbol{\mu}\cdot\hat{Y})^2\rangle_t - \langle(\boldsymbol{\mu}\cdot\hat{Z})^2\rangle_t}{\langle(\boldsymbol{\mu}\cdot\hat{Y})^2\rangle_t + 2\langle(\boldsymbol{\mu}\cdot\hat{Z})^2\rangle_t} \tag{2.21}$$

となり、等方系の場合に比べて物理的意味の不明確な量であるがために、偏光の度合いを表す量としては適切ではない。そこで平面配向系に対しては、異方性比に替わって、これを表す新たな指標が必要となる。

偏光の度合いを表す量と用いられているもので、異方性比以外のものをみてみると、まず偏光度(degree of polarization)[9]が上げられる。

$$p(t) = \frac{I_Y(t) - I_Z(t)}{I_Y(t) + I_Z(t)}$$

$$= \frac{\langle(\boldsymbol{\mu}\cdot\hat{Y})^2\rangle_t - \langle(\boldsymbol{\mu}\cdot\hat{Z})^2\rangle_t}{\langle(\boldsymbol{\mu}\cdot\hat{Y})^2\rangle_t + \langle(\boldsymbol{\mu}\cdot\hat{Z})^2\rangle_t} \tag{2.22}$$

これは直進する光の進行方向に垂直な面内での偏光性を表すことについては有利であるが、ここで議論の対象となっている、平面配向系からの蛍光に対しては、やはり異方性比と同様な意味で適切ではない。全蛍光強度の項をキャンセルし、なるべく簡単なただ一つのパラメータによって偏光性を表そうとするのであれば、むしろ、偏光比(polarization ratio)、あるいはその逆数である蛍光強度比[10]、すなわち

$$\rho(t) = \frac{I_Y(t)}{I_Z(t)}$$

$$= \frac{\langle(\boldsymbol{\mu}\cdot\hat{Y})^2\rangle_t}{\langle(\boldsymbol{\mu}\cdot\hat{Z})^2\rangle_t} \tag{2.23}$$

を用いた方が良い。

全体として等方的な系の場合、励起軸のみがその中で特異的な方向となるため、それからのずれを代表する量（すなわち異方性比；r(t)）によって偏光の度合いを充分適切に表すことが可能であった。一方、平面配向系では励起する以前からすでに特異的な方向（つまり、分子の配向軸）を有している。一般的には、この軸方向は未知と考えるべきであるから、励起することによって特別な方向が更にもう一つ導入されることになる。このような比較的複雑な系の偏光の度合いを、

ただ一つの指標で表すことは根本的に困難であり、故に何らかの二つ以上の指標のセットを用いることが必要であると考えられる。

そこであらためて(2.16)-(2.18)を見ると、偏光蛍光強度における分子配向に依存する項、すなわち、

$$M_X(t) = \int d\boldsymbol{\mu}\ n(\boldsymbol{\mu};t)\ (\boldsymbol{\mu}\cdot\hat{X})^2 = \langle(\boldsymbol{\mu}\cdot\hat{X})^2\rangle_t \qquad (2.24)$$

$$M_Y(t) = \int d\boldsymbol{\mu}\ n(\boldsymbol{\mu};t)\ (\boldsymbol{\mu}\cdot\hat{Y})^2 = \langle(\boldsymbol{\mu}\cdot\hat{Y})^2\rangle_t \qquad (2.25)$$

$$M_Z(t) = \int d\boldsymbol{\mu}\ n(\boldsymbol{\mu};t)\ (\boldsymbol{\mu}\cdot\hat{Z})^2 = \langle(\boldsymbol{\mu}\cdot\hat{Z})^2\rangle_t \qquad (2.26)$$

によって平面配向系の偏光を適切に表現し得ることが分かる。そこで以後、これらを「偏光率 (fraction of polarization)」と呼び、(2.24)-(2.26)にあるように、記号$M_X(t)$、$M_Y(t)$、$M_Z(t)$で示すことにする。なお、励起軸がY軸方向であることを強調するためには、$M_{XY}(t)$、$M_{YY}(t)$、$M_{ZY}(t)$のように励起の方向を第二の添字として付けて表す方がより適切であるが、本論文においてはY軸方向以外の励起については考えないので、簡単のために前者の記号を用いることにする。

2．5　偏光率の基本的性質

各時刻における偏光率の値は、(2.24)-(2.26)で定義された通り、励起分子が各軸に対する角度に関してどれだけ近く分布しているかを示す。(2.24)-(2.26)の中で、

$$0 \leqq (\boldsymbol{\mu}\cdot\hat{X})^2,\ (\boldsymbol{\mu}\cdot\hat{Y})^2,\ (\boldsymbol{\mu}\cdot\hat{Z})^2 \leqq 1 \qquad (2.27)$$

であることから、

$$0 \leqq M_X(t),\ M_Y(t),\ M_Z(t) \leqq 1 \qquad (2.28)$$

となることが分かる。すなわち、励起分子の配向分布が各座標軸（この座標は実験室系に固定された座標である）に近寄るほどその軸に対応する偏光率の成分の値は1に近づき、逆に軸から遠ざかるほど値は0に近づくことになる。

例えば$M_Z(t)$について考えてみる。時刻tにおいて、励起分子が全てZ軸に平行に配向分布しているとすると、分布関数はθのみの関数として

$$n(\boldsymbol{\mu};t) = n(\theta;t) = \delta(\theta=0) \qquad (2.29)$$

と表すことが出来るので、(2.26)より

$$M_Z(t) = \int_0^{\pi} d\theta \ \ \delta(\theta=0)\cos^2\theta = 1 \qquad (2.30)$$

となる。ただしδはディラックのデルタ関数を示している。

逆に全ての励起分子がZ軸と垂直に、すなわちX-Y平面上に配向分布している場合、分布関数は

$$n(\boldsymbol{\mu};t) = \delta(\theta=\pi/2)\ n'(\phi) \qquad (2.31)$$

と表すことが出来る。ここで、$n'(\phi)$は$n(\boldsymbol{\mu};t)$の中でϕのみに依存する項である。従って、(2.26)より、

$$M_Z(t) = \int_0^{\pi} d\theta \int_0^{2\pi} \sin\theta\, d\phi \ \ \delta(\theta=\pi/2)\ n'(\phi)\cos^2\theta$$
$$= 0 \qquad (2.32)$$

となることが分かる。

ちなみに、励起分子が全方位に一様に分布している場合には、

$$n(\boldsymbol{\mu};t) = \frac{1}{4\pi} \qquad (2.33)$$

であるから、偏光率の各成分は皆同じ値となり、

$$M_X(t) = M_Y(t) = M_Z(t) = \frac{1}{3} \qquad (2.34)$$

となる。

また偏光率の緩和時間は、分子の揺動運動の角度範囲と速度を反映しており、範囲が広く揺動が遅いほど緩和時間は遅くなり、逆に範囲が狭く揺動が速いほど緩和時間は速くなる。

このように、偏光率はその示す内容が直感性に優れているために、分子の分布に関するモデルを用いることなく、分子運動、配向について定性的に理解することが可能である。

ところで、偏光率の三つの成分の和は、

$$M_X(t) + M_Y(t) + M_Z(t) = \int d\boldsymbol{\mu}\ \ n(\boldsymbol{\mu};t)\ (\boldsymbol{\mu}\cdot\hat{X})^2$$
$$+ \int d\boldsymbol{\mu}\ \ n(\boldsymbol{\mu};t)\ (\boldsymbol{\mu}\cdot\hat{Y})^2$$

$$+\int d\mu\ n(\mu;t)\ (\mu\cdot\hat{Z})^2$$

$$=\int d\mu\ n(\mu;t)\ [\ (\mu\cdot\hat{X})^2+(\mu\cdot\hat{Y})^2+(\mu\cdot\hat{Z})^2\ ]$$

$$=\int d\mu\ n(\mu;t)$$

$$=1 \qquad (2.35)$$

であり、必ず1となる。このことからも分かるように、偏光率の三つの成分の内、独立であるのは本来二つだけである。しかし一般に3成分は互いに異なる役割を持ち、皆同等に扱われるべきであり、どれか2成分だけを選択する積極的理由はない。従って偏光率を用いた議論をする際には、3成分全てをまとめて示すことが望ましい。

【参考文献】

(1) J.R. Lakowicz, "Principle of fluorescence spectroscopy," Plenum Press, New York, 1983, pp.112-151.

(2) 御橋廣眞、「螢光測定　生物科学への応用」(木下一彦、御橋廣眞編)、学会出版センター、1983、pp.1-43。

(3) L.L.Chapoy and D.B.DuPré, J.Chem.Phys., **70**(1978)2550.

(4) A.Szabo, J.Chem.Phys., **72**(1980)4260.

(5) J.J.Fisz, Chem.Phys., **132**(1989)303.

(6) J.D.LeGrange, H.E.Riegler and W.P.Zurawsky, Thin Solid Films, **159**(1988)101.

(7) J.D.LeGendre and H.Riegler, J.Chem.Phys., **90**(1988)3838.

(8) L.B.-Å.Johansson and V.Sundström, Chem.Phys.Letters, **167**(1990)383.

(9) 西島安則、「蛍光測定の原理と生体系への応用」(「蛋白質　核酸　酵素」編集部編)、共立出版、1974、pp.92-103。

(10) N.Kimura, R.Tsuneta, T.Araiso, T.Koyama, N.Hasagawa, T.Ishii and K.Mukasa, Chem.Phys.Lipids, **57**(1991)39.

第3章　モデルを用いた偏光解消解析法

3．1　蛍光強度比を用いた解析法[1]

蛍光プローブを挿入したＬＢ膜の蛍光の偏光成分をFig. 3.1で示される様な系で測定し、(2.23)で定義されている蛍光強度比が求められた場合、「一軸配向円錐内揺動運動モデル」（Fig. 3.2）を用いることによって、分子の配向、および揺動運動の角度範囲の定量的解析が可能となる。このモデルは巨視的等方系での研究で用いられてきた円錐内揺動運動モデルからの類推であり、次のように仮定されたものである。

(1) 分子は、角度θ_c（これを揺動角と呼ぶ）の仮想円錐内に束縛されて、揺動運動をしている。すなわち角度幅θ_cのステップ関数状のポテンシャル内に束縛されている。

(2) この円錐の軸は、基板の法線方向から下向きに角度δ（これを配向角と呼ぶ）だけ傾いている。（このモデルでは常に$\gamma=0$である。）

(3) 基板は完全な平滑平面であり、分子はその上に一様に並んでいる。

(4) 蛍光分子の吸収双極子および発光双極子は、共にその分子の長軸に平行である。

以上の様に仮定されたモデルで表されるＬＢ膜試料を原点に置き、Ｙ軸（鉛直方向）に対して角度αだけ傾いた方向（単位ベクトル$\boldsymbol{\varepsilon}$で表す；$\boldsymbol{\varepsilon} = \hat{X}\sin\alpha + \hat{Y}\cos\alpha$）に偏光している$\delta$関数的パルス光で励起する。

このとき、t=0（励起した瞬間）とt=∞（充分時間が経ち、励起分子の分布が再び一様に分散したとき）における励起分子の配向分布は、(2.1)によりそれぞれ次のように与えられる。

$$n(\boldsymbol{\mu};0) = \kappa\ feq(\boldsymbol{\mu})\ (\boldsymbol{\varepsilon}\cdot\boldsymbol{\mu})^2 \quad (3.1)$$

$$n(\boldsymbol{\mu};\infty) = feq(\boldsymbol{\mu}) \quad (3.2)$$

但しここでκは規格化定数を示す。

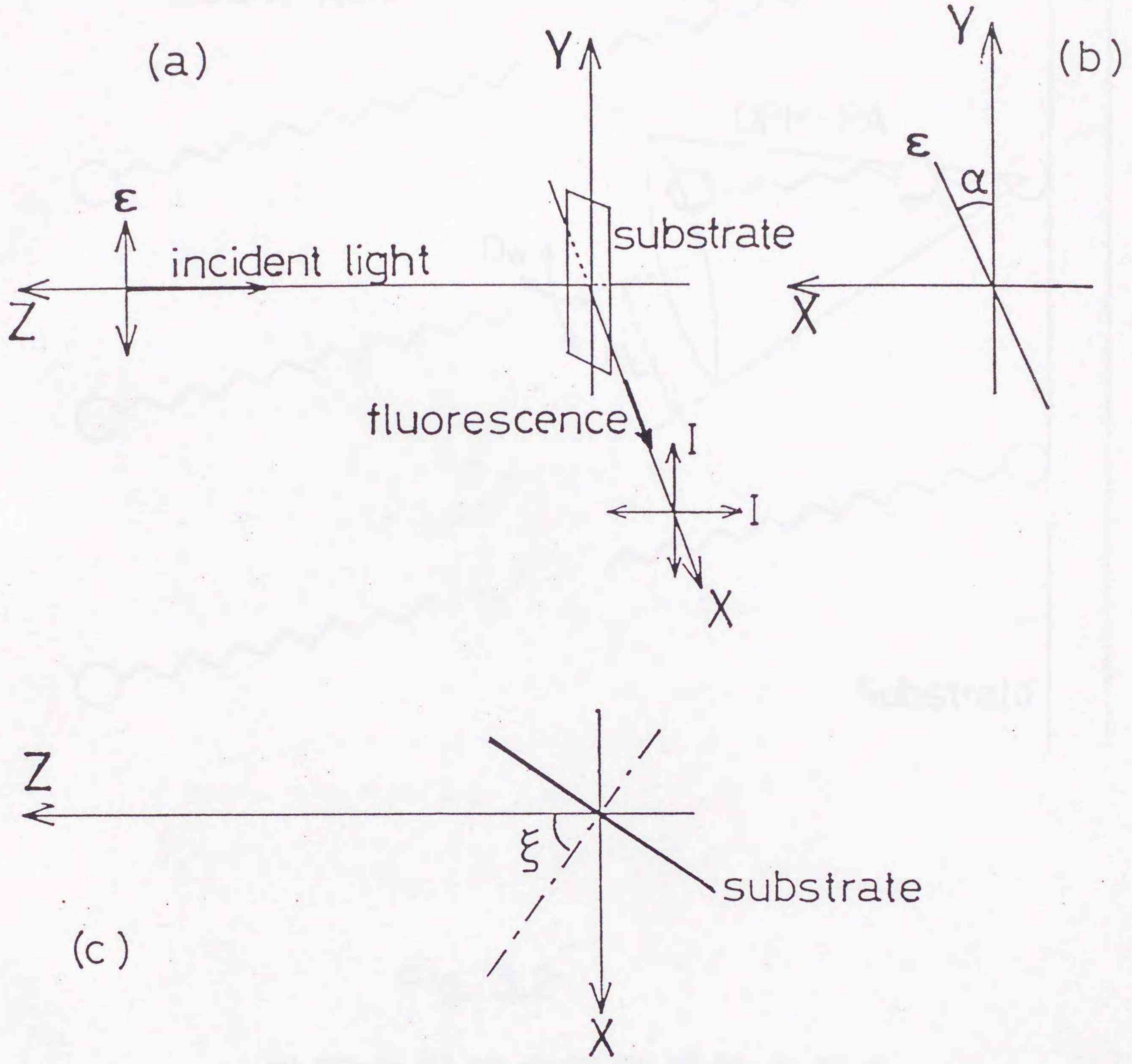


Fig. 3.1 LB膜の蛍光偏光測定

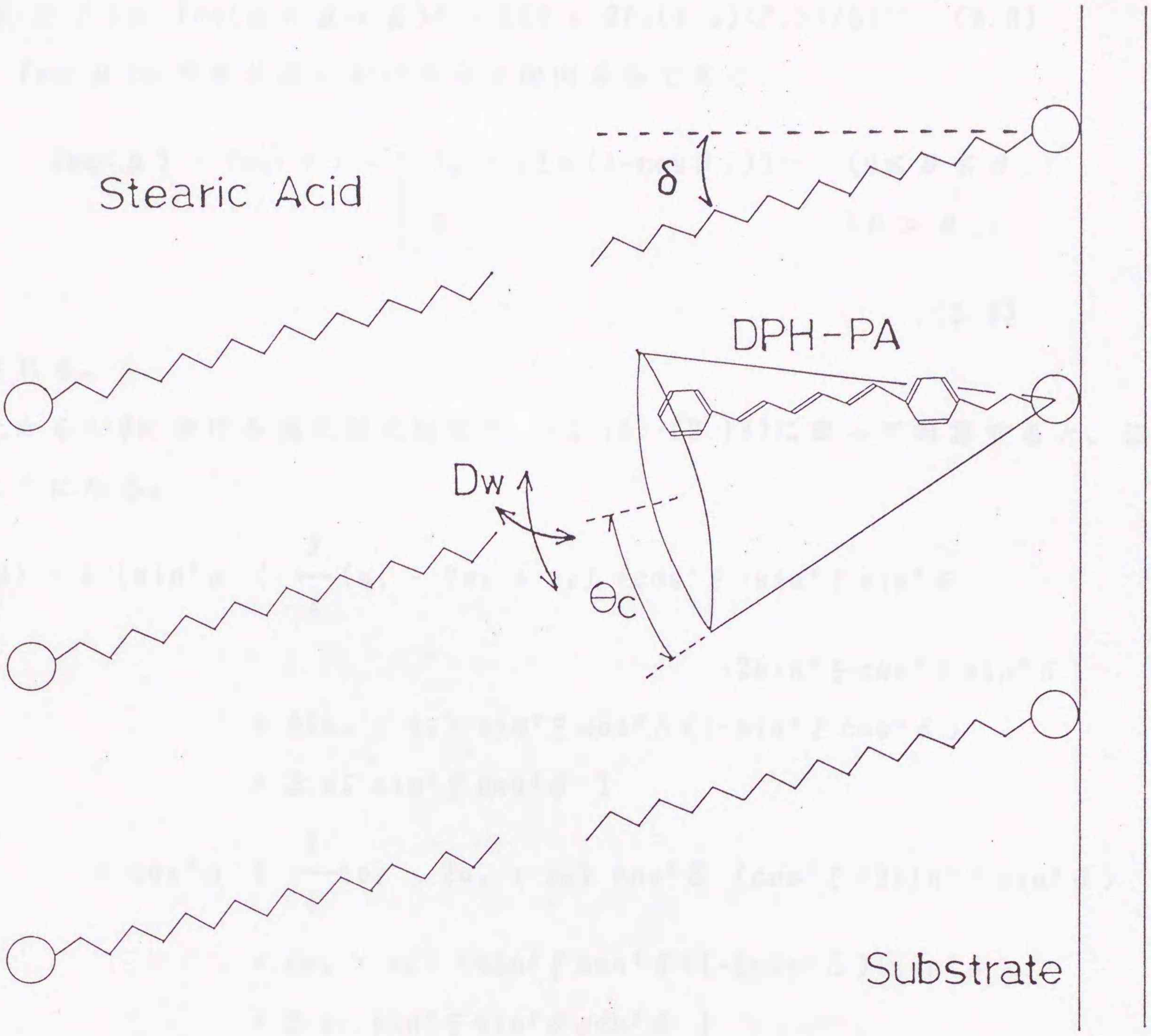


Fig. 3.2

一軸配向円錐内揺動運動モデル

$$\kappa = \int d\boldsymbol{\mu}\ feq(\boldsymbol{\mu})(\boldsymbol{\mu}\cdot\boldsymbol{\varepsilon})^2 = [(1 + 2P_2(r_{32})\langle P_2\rangle)/3]^{-1} \quad (3.3)$$

また、$feq(\boldsymbol{\mu})$は平衡状態における分子配向分布であり、

$$feq(\boldsymbol{\mu}) = feq(\theta) = \begin{cases} f_0 = [2\pi(1-\cos\theta_c)]^{-1} & (0 \leqq \theta \leqq \theta_c) \\ 0 & (\theta > \theta_c) \end{cases}$$

(3.4)

と表される。

以上からt=0における偏光蛍光強度を、(2.16)-(2.18)に従って計算すると、以下のようになる。

$$\begin{aligned} I_X(0) = J^0[&\sin^2\alpha \ \{ \frac{3}{4}(u_1 - 2u_3 + u_5)(\cos^4\xi + \sin^4\xi\sin^4\delta \\ &\qquad + 2\sin^2\xi\cos^2\xi\sin^2\delta) \\ &\qquad + 6(u_3 - u_5)\sin^2\xi\cos^2\delta(1-\sin^2\xi\cos^2\delta) \\ &\qquad + 2u_5\sin^4\xi\cos^4\delta \ \} \\ &+ \cos^2\alpha \ \{ \frac{1}{4}(u_1 - 2u_3 + u_5)\cos^2\delta\ (\cos^2\xi + 3\sin^2\xi\sin^2\delta) \\ &\qquad + (u_3 - u_5)(\sin^2\xi\cos^2\delta(1-6\sin^2\delta) + \sin^2\delta) \\ &\qquad + 2u_5\sin^2\xi\sin^2\delta\cos^2\delta \ \} \\ &+ 2\sin\alpha\cos\alpha\sin\xi\sin\delta\cos\delta \\ &\qquad \{ \frac{1}{4}(u_1 - 2u_3 + u_5)(\cos^2\xi + 3\sin^2\xi\sin^2\delta) \\ &\qquad + 3(u_3 - u_5)(\sin^2\xi(\cos^2\delta - \sin^2\delta) - \cos^2\xi) \\ &\qquad - 2u_5\sin^2\xi\cos^2\delta \ \} \ ] \end{aligned}$$

(3.5)

$$\begin{aligned} I_Y(0) = J^0[&\sin^2\alpha \ \{ \frac{1}{4}(u_1 - 2u_3 + u_5)\cos^2\delta\ (\cos^2\xi + 3\sin^2\xi\sin^2\delta) \\ &\qquad + (u_3 - u_5)(1-\cos^2\xi\cos^2\delta - 6\sin^2\xi\sin^2\delta\cos^2\delta) \\ &\qquad + 2u_5\sin^2\xi\sin^2\delta\cos^2\delta \ \} \\ &+ \cos^2\alpha \ \{ \frac{3}{4}(u_1 - 2u_3 + u_5)\cos^4\delta \end{aligned}$$

$$+ 6\,(u_3 - u_5)\sin^2\delta\cos^2\delta + 2\,u_5\sin^4\delta\ \}$$

$$+ 2\sin\alpha\cos\alpha\sin\xi\sin\delta\cos\delta$$

$$\{\ \frac{3}{4}(u_1 - 2u_3 + u_5)\cos^2\delta$$

$$+ 3\,(u_3 - u_5)(\sin^2\delta - \cos^2\delta)$$

$$- 2\,u_5\sin^2\delta\ \}\ ] \qquad (3.6)$$

$$I_Z(0) = J^0[\sin^2\alpha\ \{\ \frac{1}{4}(u_1 - 2u_3 + u_5)(3\sin^2\xi\cos^2\xi(1+\sin^4\delta)$$

$$+\sin^2\delta(1-6\sin^2\xi\cos^2\xi))$$

$$+ (u_3 - u_5)\cos^2\delta(1-6\sin^2\xi\cos^2\xi\cos^2\delta)$$

$$+ 2\,u_5\sin^2\xi\cos^2\xi\cos^4\delta\ \}$$

$$+ \cos^2\alpha\ \{\ \frac{1}{4}(u_1 - 2u_3 + u_5)\cos^2\delta\ (\sin^2\xi + 3\cos^2\xi\sin^2\delta)$$

$$+ (u_3 - u_5)(\cos^2\xi\cos^2\delta(1-6\sin^2\delta)+\sin^2\delta)$$

$$+ 2\,u_5\cos^2\xi\sin^2\delta\cos^2\delta\ \}$$

$$+ 2\sin\alpha\cos\alpha\sin\xi\sin\delta\cos\delta$$

$$\{\ \frac{1}{4}(u_1 - 2u_3 + u_5)(1-3\cos^2\xi\cos^2\delta)$$

$$+ 5\,(u_3 - u_5)\cos^2\xi(\cos^2\delta - \sin^2\delta)$$

$$- 2\,u_5\cos^2\xi\cos^2\delta\ \}\ ] \qquad (3.7)$$

また、$t=\infty$においては、

$$I_X(\infty) = J^{\infty}[(u_1-u_3)(1-\sin^2\xi\cos^2\delta) + 2u_3\sin^2\xi\cos^2\delta] \qquad (3.8)$$

$$I_Y(\infty) = J^{\infty}[(u_1-u_3)\cos^2\delta + 2u_3\sin^2\delta] \qquad (3.9)$$

$$I_Z(\infty) = J^{\infty}[(u_1-u_3)(1-\cos^2\xi\cos^2\delta) + 2u_3\cos^2\xi\cos^2\delta] \qquad (3.10)$$

となる。但し、

$$J^0 = \kappa\pi I_T(0)\ f_0 \qquad (3.11)$$

$$J^{\infty} = \pi I_T(\infty)\ f_0 \qquad (3.12)$$

そして、

$$u_n = \frac{1 - \cos^n\theta_c}{n} \tag{3.13}$$

である。(3.5)-(3.10)を$\chi=\cos\theta_c$の多項式として、

$$I_X(0) = J^0 (a_{X5}\chi^5 + a_{X3}\chi^3 + a_{X1}\chi + a_{X0}) \tag{3.14}$$

$$I_Y(0) = J^0 (a_{Y5}\chi^5 + a_{Y3}\chi^3 + a_{Y1}\chi + a_{Y0}) \tag{3.15}$$

$$I_Z(0) = J^0 (a_{Z5}\chi^5 + a_{Z3}\chi^3 + a_{Z1}\chi + a_{Z0}) \tag{3.16}$$

$$I_X(\infty) = J^\infty (b_{X3}\chi^3 + b_{X1}\chi + b_{X0}) \tag{3.17}$$

$$I_Y(\infty) = J^\infty (b_{Y3}\chi^3 + b_{Y1}\chi + b_{Y0}) \tag{3.18}$$

$$I_Z(\infty) = J^\infty (b_{Z3}\chi^3 + b_{Z1}\chi + b_{Z0}) \tag{3.19}$$

と云う形式に整理することが出来る。ここでa、bはα、ξ、δをパラメータとして含む係数である。

(3.15),(3.16),(3.18),(3.19)より蛍光強度比(2.23)を計算し、それを変形すると次の式が得られる。

$$(a_{Z5}-\rho_0 a_{X5})\chi^5 + (a_{Z3}-\rho_0 a_{X3})\chi^3 + (a_{Z1}-\rho_0 a_{X1})\chi + (a_{Z0}-\rho_0 a_{X0}) = 0 \tag{3.20}$$

$$(b_{Z3}-\rho_\infty b_{X3})\chi^3 + (b_{Z1}-\rho_\infty b_{X1})\chi + (b_{Z0}-\rho_\infty b_{X0}) = 0 \tag{3.21}$$

ここで、$\rho_0=I_Y(0)/I_Z(0)$、$\rho_\infty=I_Y(\infty)/I_Z(\infty)$である。これらの式の中で、$\alpha$と$\xi$の値は実験の際の設定条件として既知であり、また、$\rho_0$と$\rho_\infty$の値は測定値として与えられる。従って(3.20)と(3.21)はθ_cとδに関する連立方程式となる。すなわちこれを解くことで、LB膜分子の揺動運動の角度範囲（揺動角；θ_c）と平均の配向角（δ）を求めることが出来る。但しこの連立方程式は、数学的には一般に複数の解を持つため、その中から現実的に意味のある解を選択する必要がある。

3．2　偏光率を用いた解析法－揺動角、配向角

前節で述べた様に、偏光解消の測定結果を蛍光強度比を用いて表し、(3.20),(3.21)式を解くことで揺動角と配向角とを求めることが出来ることが分かった。しかしこの方法では、配向角として下向き一方向に傾いているものしか扱うことが出来ない。すなわち、配向の方位角成分（γ）を未知変数としてモデルの中に組み込むことが出来なかった。これは、解析するにあたって蛍光強度比を用いたために、蛍光偏光のX成分が無視され、さらに後の2成分の比しか考慮されておらず、扱える未知変数の数がその分だけ制限されたからである。

さらに、先に述べたように、蛍光強度比それ自体の物理的意味は余り明確ではないため、単に解析計算の途中に出てくる中間変数程度の意味しか持っていない。従って上述のモデル解析の計算をしない限り、分子の揺動、配向の状態を知ることは出来ない。

しかし偏光率を用いる場合には、その内容が直感性に優れているため、2．5節で述べた基本的性質に関する議論から、モデル計算無しでも、その値によって直接に定性的な状態を知ることが出来る。また、偏光率は蛍光偏光の3成分全てを含んでいるため、より正確なモデルの仮定が可能となる。すなわち、分子の平均の配向角として、極角成分（δ）と方位角成分（γ）の両方を考慮した、現実的なモデルを用いた解析を行うことが出来る（Fig. 3.3）。

その具体的方法を以下に述べる。ここでは上で述べたように、前節で仮定したモデルをさらに拡張し、配向角として方位角成分も未知数として扱う。また、励起光の偏光方向はY軸に限定して考える（$\boldsymbol{\varepsilon}=\hat{Y}$）。そのモデルの下でt=0とt=∞における励起分子の配向分布を理論的に計算すると、

$$n(\boldsymbol{\mu};0) = \kappa\, feq(\boldsymbol{\mu})(\boldsymbol{\mu}\cdot\hat{Y})^2 \tag{3.22}$$

$$n(\boldsymbol{\mu};\infty) = feq(\boldsymbol{\mu}) \tag{3.23}$$

となる。但しここで、$feq(\boldsymbol{\mu})$は(3.4)で定義されている平衡状態における分子配向分布である。また、κは規格化定数であり、

$$\kappa = \int d\boldsymbol{\mu}\ feq(\boldsymbol{\mu})(\boldsymbol{\mu}\cdot\boldsymbol{\varepsilon})^2 = [(1 + 2P_2(r_{32})\langle P_2\rangle)/3]^{-1} \tag{3.24}$$

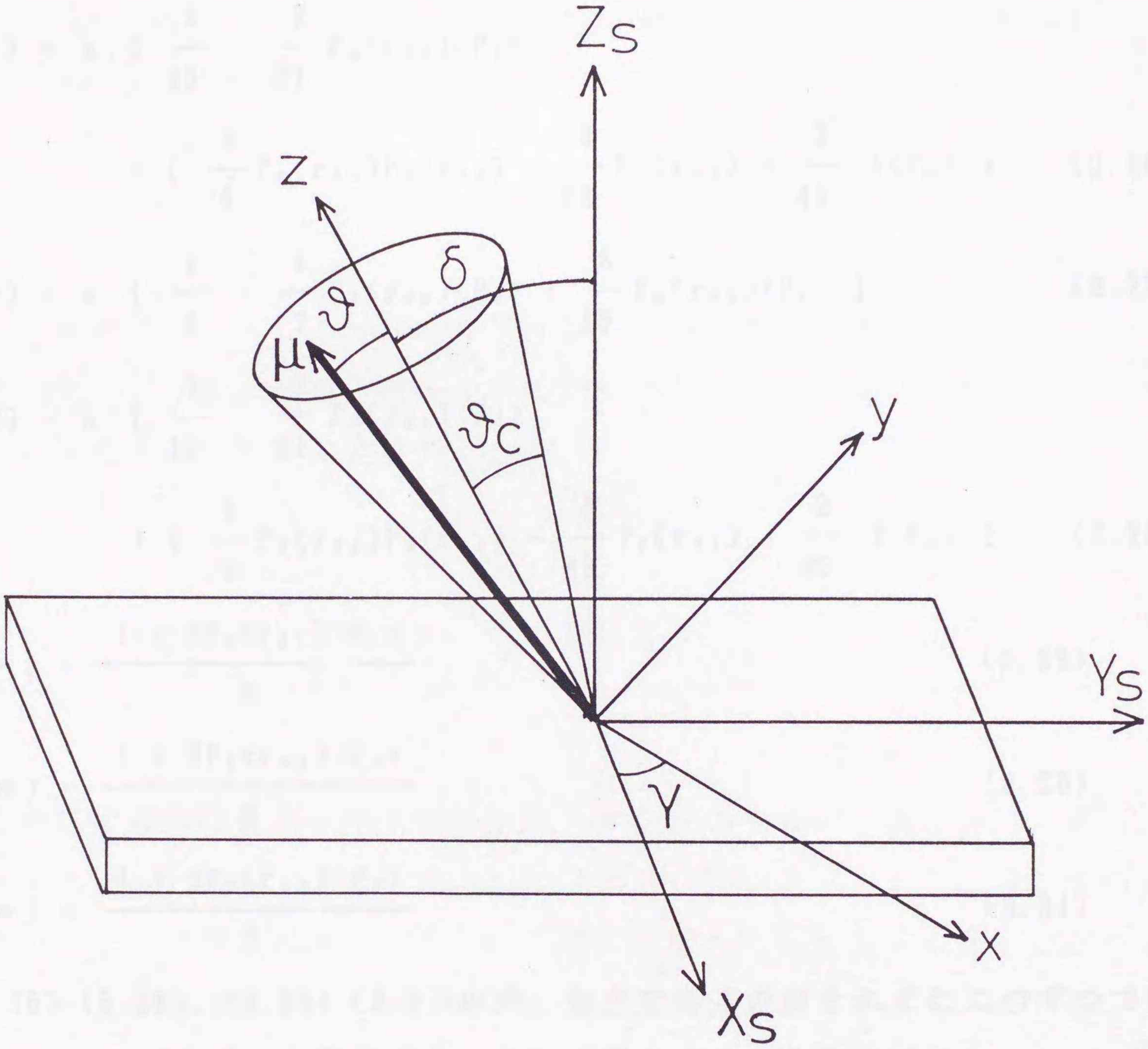


Fig. 3.3　配向の方位角成分を考慮した
一軸配向揺動円錐モデル

と表される。ここで、r_{ij}は(2.16)で定義されている行列Rの成分を示している。

また$\langle P_n \rangle$はn次のルジャンドル関数の、平衡分布に関する平均、すなわち

$$\langle P_n \rangle = \int d\mu \ feq(\mu)\ P_n(\cos\theta) \quad (3.25)$$

である。

以上を元に、t=0とt=∞での偏光率を理論的に計算すると次のようになる。

$$M_X(0) = \kappa \left[\frac{1}{15} - \frac{2}{21} P_2(r_{33})\langle P_2 \rangle + \left(\frac{4}{9} P_2(r_{31}) P_2(r_{32}) - \frac{8}{63} P_2(r_{33}) + \frac{2}{45} \right) \langle P_4 \rangle \right] \quad (3.26)$$

$$M_Y(0) = \kappa \left[\frac{1}{5} - \frac{4}{7} P_2(r_{32})\langle P_2 \rangle + \frac{8}{35} P_4(r_{32})\langle P_4 \rangle \right] \quad (3.27)$$

$$M_Z(0) = \kappa \left[\frac{1}{15} - \frac{2}{21} P_2(r_{31})\langle P_2 \rangle + \left(\frac{4}{9} P_2(r_{32}) P_2(r_{33}) - \frac{8}{63} P_2(r_{31}) + \frac{2}{45} \right) \langle P_4 \rangle \right] \quad (3.28)$$

$$M_X(\infty) = \frac{1 + 2P_2(r_{31})\langle P_2 \rangle}{3} \quad (3.29)$$

$$M_Y(\infty) = \frac{1 + 2P_2(r_{32})\langle P_2 \rangle}{3} \quad (3.30)$$

$$M_Z(\infty) = \frac{1 + 2P_2(r_{33})\langle P_2 \rangle}{3} \quad (3.31)$$

(3.26)-(3.28)、(3.29)-(3.31)の内、独立であるのはそれぞれ二つずつであるので、どれか二式ずつを選択する。これに偏光率の測定値を代入し、r_{31}、r_{32}、r_{33}の内の二つ、および$\langle P_2 \rangle$、$\langle P_4 \rangle$の計4つを未知数とする4式からなる連立方程式を作る。

まずこの連立方程式を解き$\langle P_2 \rangle$と$\langle P_4 \rangle$を求める。円錐内揺動運動モデルの場合、

$$\langle P_2 \rangle = \frac{1}{2} \cos\theta_c (1+\cos\theta_c) \quad (3.32)$$

$$\langle P_4 \rangle = \frac{1}{8} \cos\theta_c (1+\cos\theta_c)(7\cos^2\theta_c - 3) \quad (3.33)$$

の関係が成り立つので、これより揺動角θ_cを求めることが出来る。

次にr_{3i}に関して方程式を解くと、3成分の内の二つが解として求められるが、

$$r_{31}^2 + r_{32}^2 + r_{33}^2 = 1 \quad (3.34)$$

の関係があるために求められた二つから、残り一つも得ることが出来る。そして、行列Gは実験条件の設定値として既知であるから、

$$D = RG^T \quad (3.35)$$

よりd_{31}、d_{32}、d_{33}が得られ、更に

$$\delta = \arccos d_{33} \quad (3.36)$$

$$\gamma = \arctan \frac{d_{31}}{-d_{32}} \quad (3.37)$$

によって配向の極角δと方位角γを求めることが出来る。ただしこのδとγの数学的解として、一般に複数の組み合わせの解が得られるため、その中から現実的に妥当なものを選択する必要がある。

3.3 偏光率を用いた解析法－揺動拡散定数

分子の揺動運動の速度を表す揺動拡散定数を求める場合、異方性比、あるいは蛍光強度比を用いると、それらは(2.21)、(2.23)で示されるように分子配向に関する項の比として表されているために、揺動拡散定数との関係を表す式はかなり複雑なものとならざるをえない。ところが偏光率は分子配向の項そのものであるため、これを用いると、以下のように比較的簡単な数式により揺動拡散定数（D_w）を求めることが可能となる。

分子の揺動運動による配向拡散過程は、次のようなスモルコフスキー方程式によって記述される[2]。

$$\frac{\partial n(\boldsymbol{\mu};t)}{\partial t} = D_w \Lambda^2 n(\boldsymbol{\mu};t) \qquad (0 \leqq \theta \leqq \theta_c) \quad (3.38)$$

ただし、境界条件は

$$\left.\frac{\partial n(\mu;t)}{\partial \theta}\right|_{\theta=\theta_0} = 0 \qquad (3.39)$$

である。また、Λ^2はルジャンドリアンと呼ばれる演算子で、次のように表されている[(3)]。

$$\Lambda^2 = \frac{1}{\sin^2\theta}\frac{\partial^2}{\partial\phi^2} + \frac{1}{\sin\theta}\frac{\partial}{\partial\theta}\sin\theta\frac{\partial}{\partial\theta} \qquad (3.40)$$

(2.24)と(3.38)より、偏光率の時間微分は

$$\frac{d\,M_X(t)}{dt} = \frac{d}{dt}\int d\mu\ n(\mu;t)\ (\mu\cdot\hat{X})^2$$

$$= \int d\mu\ (\mu\cdot\hat{X})^2\ \frac{\partial n(\mu;t)}{\partial t}$$

$$= D_w \int d\mu\ (\mu\cdot\hat{X})^2\ \Lambda^2\ n(\mu;t) \qquad (3.41)$$

と表すことができる(Y、Zについても同様)。ここで上式中の積分に関して、t=0における値は(3.22)を用いて次のように理論的に計算することが出来る。

$$\int d\mu\ (\mu\cdot\hat{X})\ \Lambda^2\ n(\mu;0)$$

$$= \kappa\ [\ \frac{4}{15} - \frac{8}{21}P_2(r_{33})\langle P_2\rangle$$

$$+ (\frac{16}{9}P_2(r_{31})P_2(r_{32}) - \frac{32}{63}P_2(r_{33}) + \frac{8}{45})\langle P_4\rangle\ ] \qquad (3.42)$$

$$\int d\mu\ (\mu\cdot\hat{Y})\ \Lambda^2\ n(\mu;0)$$

$$= \kappa\ [\ -\frac{8}{15} - \frac{8}{21}P_2(r_{32})\langle P_2\rangle + \frac{32}{35}P_4(r_{32})\langle P_4\rangle\ ] \qquad (3.43)$$

$$\int d\mu\ (\mu\cdot\hat{Z})\ \Lambda^2\ n(\mu;0)$$

$$= \kappa\ [\ \frac{4}{15} - \frac{8}{21}P_2(r_{31})\langle P_2\rangle$$

$$+ (\frac{16}{9}P_2(r_{33})P_2(r_{32}) - \frac{32}{63}P_2(r_{31}) + \frac{8}{45})\langle P_4\rangle\ ] \qquad (3.44)$$

従って、t=0における偏光率の時間微分(偏光率の初期勾配)を用いることによって、揺動拡散定数は

$$D_w = \frac{\left.\dfrac{dM_X(t)}{dt}\right|_{t=0}}{\int d\boldsymbol{\mu}\ (\boldsymbol{\mu}\cdot\hat{X})^2\ \Lambda^2\ n(\boldsymbol{\mu};0)} \qquad (3.45)$$

と表すことが出来る（Y、Zについても同様）。

すなわち、時間分解測定によって偏光率の初期勾配（$dM_X(t)/dt|_{t=0}$、$dM_Y(t)/dt|_{t=0}$、$dM_Z(t)/dt|_{t=0}$）が得られれば、(3.42)-(3.44)の内の何れか１式と(3.45)を用いて拡散揺動定数D_wを算出することが出来ることになる。なお、(3.42)-(3.44)の内のどれを選択するかにより３通りの値が得られることになるが、前述のモデルが妥当であるならばそれら３つの値は一致する。逆にもし異なる値が得られたとすると、それは用いたモデルが妥当でないか、あるいは実際に方向によって揺動拡散の速度が異なることを意味していると考えられる。

３．４　偏光率の時間変化の計算[4]

偏光率の時間変化の様子を計算することは、理論的考察、解析を行う上での重要な手段となる。そのためには、まず配向分布関数を求める必要がある。まず、考慮しているモデルによって決まる初期条件と境界条件（例えば先の一軸配向円錐内揺動運動モデルの場合には、初期条件は(3.22)、境界条件は(3.39)で記述される）の下で、スモルコフスキー方程式(3.38)を解いて励起分子の配向分布関数$n(\theta,\phi;t)$を求め、(2.24)-(2.26)により偏光率を計算すれば良い。(3.38)の形式の方程式の解は、一般には球面調和関数、すなわち極角θに関するルジャンドルの陪関数、方位角ϕに関する虚数の指数関数（あるいは三角関数）の組み合わせによって次式のように展開して表すことができる。

$$n(\theta,\phi;t) = \Sigma_{n,m}\ C_n^m\ P_n^m(\cos\theta)\ \exp(im\phi)\ \exp(-D_w n(n+1)t) \qquad (3.46)$$

なお、C_mは展開係数である。しかし揺動円錐の場合ように、ある限られた角度範囲でしか値を持たない関数を扱う場合には、通常の球面調和関数、すなわち整数添字を持つルジャンドル陪関数によって単純に展開するわけにはいかない。

この場合の解は、実数の添字を持つルジャンドル陪関数を用いて、変数分離法

により以下のように展開することが出来る。

$$n(\theta,\phi;t)=\kappa f_0\Big[\frac{1}{3}$$

$$+\frac{2}{3}P_2(\cos\theta_\varepsilon)\ \Sigma_{\nu_0}\ c_{\nu_0}P_{\nu_0}(\cos\theta)\exp(-D_w\nu_0(\nu_0+1)t)$$

$$+\frac{2}{9}\cos(\phi_\varepsilon-\phi)\ P_2^1(\cos\theta_\varepsilon)\ \Sigma_{\nu_1}\ c_{\nu_1}^1P_{\nu_1}^1(\cos\theta)\exp(-D_w\nu_1(\nu_1+1)t)$$

$$+\frac{1}{18}\cos2(\phi_\varepsilon-\phi)\ P_2^2(\cos\theta_\varepsilon)\ \Sigma_{\nu_2}\ c_{\nu_2}^2P_{\nu_2}^2(\cos\theta)\exp(-D_w\nu_2(\nu_2+1)t)\Big] \qquad (3.47)$$

ここで、θ_εとϕ_εは励起ベクトルεの(x,y,z)系における極角と方位角を示す。ここではY軸励起（$\varepsilon=\hat{Y}$）を前提としているので、$\cos\theta_\varepsilon=r_{32}=\sin\delta\sin\gamma\sin\zeta-\sin\delta\cos\gamma\cos\zeta$である。また、添字$\nu_m$（m=0,1,2）は境界条件(3.39)で決まる実数であり、この条件を満たすν_mはそれぞれのmに対して複数個存在する。具体的には次の方程式

$$\left.\frac{dP_{\nu_m}^m(\cos\theta)}{d\theta}\right|_{\theta=\theta_c}=0 \qquad (3.48)$$

を満たす実数ν_mを数値計算によって決定する。また、$P_{\nu_m}^m(\cos\theta)$も漸化式を用いて数値計算によって求められる。展開係数$c_{\nu_m}^m$は初期条件(3.22)によって決定され、次のように表される。

$$c_{\nu_0}=\frac{\dfrac{-3\sin^2\theta_c\cos\theta_c}{(\nu_0+3)(\nu_0-2)}P_{\nu_0}(\cos\theta_c)}{2\pi\int_0^{\theta_c}\sin\theta\,d\theta\ \{P_{\nu_0}(\cos\theta)\}^2} \qquad (3.49)$$

$$c_{\nu_1}^1=\frac{\dfrac{3\sin\theta_c\cos2\theta_c}{(\nu_1+3)(\nu_1-2)}P_{\nu_1}^1(\cos\theta_c)}{2\pi\int_0^{\theta_c}\sin\theta\,d\theta\ \{P_{\nu_1}^1(\cos\theta)\}^2} \qquad (3.50)$$

$$c_{\nu_2}^{2} = \frac{\dfrac{6\sin^2\theta_c\cos\theta_c}{(\nu_2+3)(\nu_2-2)} P_{\nu_2}^{2}(\cos\theta_c)}{2\pi \int_0^{\theta_c} \sin\theta\, d\theta \ \{P_{\nu_2}^{2}(\cos\theta)\}^2} \qquad (3.51)$$

以上のようにして表現された配向分布関数n(θ, φ;t)を用いると、(2.24)-(2.26)より偏光率の時間変化を表す式を以下のように得ることが出来る。

$$\begin{aligned} M_X(t) = \frac{\kappa f_0}{9} [\ 1 &+ \frac{1}{2}(3r_{31}^2 + 3r_{32}^2 - 2)\langle P_2\rangle \\ &+ (3r_{31}^2-1)(3r_{32}^2-1) \sum_{\nu_0} C_{\nu_0} P_{\nu_0}(\cos\theta) \exp(-D_w\nu_0(\nu_0+1)t) \\ &- r_{31}^2 r_{32}^2 \sum_{\nu_1} C_{\nu_1}^1 P_{\nu_1}^1(\cos\theta) \exp(-D_w\nu_1(\nu_1+1)t) \\ &+ \frac{1}{8}(r_{31}^2 r_{32}^2 - r_{33}^2) \sum_{\nu_2} C_{\nu_2}^2 P_{\nu_2}^2(\cos\theta) \exp(-D_w\nu_2(\nu_2+1)t) \end{aligned} \qquad (3.52)$$

$$\begin{aligned} M_Y(t) = \frac{\kappa f_0}{9} [\ 1 &+ (3r_{31}^2 - 1)\langle P_2\rangle \\ &+ (3r_{32}^2-1)^2 \sum_{\nu_0} C_{\nu_0} P_{\nu_0}(\cos\theta) \exp(-D_w\nu_0(\nu_0+1)t) \\ &+ 2(1-r_{32}^2) r_{32}^2 \sum_{\nu_1} C_{\nu_1}^1 P_{\nu_1}(\cos\theta) \exp(-D_w\nu_1(\nu_1+1)t) \\ &+ \frac{1}{8}(1-r_{32}^2) \sum_{\nu_2} C_{\nu_2}^2 P_{\nu_2}^2(\cos\theta) \exp(-D_w\nu_2(\nu_2+1)t) \end{aligned} \qquad (3.53)$$

$$\begin{aligned} M_Z(t) = \frac{\kappa f_0}{9} [\ 1 &+ \frac{1}{2}(3r_{33}^2 + 3r_{32}^2 - 2)\langle P_2\rangle \\ &+ (3r_{33}^2-1)(3r_{32}^2-1) \sum_{\nu_0} C_{\nu_0} P_{\nu_0}(\cos\theta) \exp(-D_w\nu_0(\nu_0+1)t) \\ &- r_{33}^2 r_{32}^2 \sum_{\nu_1} C_{\nu_1}^1 P_{\nu_1}^1(\cos\theta) \exp(-D_w\nu_1(\nu_1+1)t) \\ &+ \frac{1}{8}(r_{33}^2 r_{32}^2 - r_{31}^2) \sum_{\nu_2} C_{\nu_2}^2 P_{\nu_2}^2(\cos\theta) \exp(-D_w\nu_2(\nu_2+1)t) \end{aligned} \qquad (3.54)$$

上式中における係数は$C_{\nu_m}^{m}$は次のように与えられる。

$$C_{\nu_0} = \frac{\left[\frac{-3\sin^2\theta_c \cos\theta_c}{(\nu_0+3)(\nu_0-2)} P_{\nu_0}(\cos\theta_c) \right]^2}{2\pi \int_0^{\theta_c} \sin\theta \, d\theta \, \{P_{\nu_0}(\cos\theta)\}^2} \tag{3.55}$$

$$C_{\nu_1}^{1} = \frac{\left[\frac{3\sin\theta_c \cos 2\theta_c}{(\nu_1+3)(\nu_1-2)} P_{\nu_1}^{1}(\cos\theta_c) \right]^2}{2\pi \int_0^{\theta_c} \sin\theta \, d\theta \, \{P_{\nu_1}^{1}(\cos\theta)\}^2} \tag{3.56}$$

$$C_{\nu_2}^{2} = \frac{\left[\frac{6\sin^2\theta_c \cos\theta_c}{(\nu_2+3)(\nu_2-2)} P_{\nu_2}^{2}(\cos\theta_c) \right]^2}{2\pi \int_0^{\theta_c} \sin\theta \, d\theta \, \{P_{\nu_2}^{2}(\cos\theta)\}^2} \tag{3.57}$$

これらの係数の表式の中で、ν_mは先に述べたように(3.48)から数値的に求められるわけであるが、θ_cが決まればそれに対応してν_mも決定される。また、それとともに$P_{\nu_m}^{m}(\cos\theta)$の表式、$P_{\nu_m}^{m}(\cos\theta_c)$、(3.55)-(3.57)の分母の項も決まることになる。つまり、θ_cの値に対応して$C_{\nu_m}^{m}$も定まるわけであるから、あらかじめ計算した値をθ_cとセットにしてデータファイルとして保存しておき、必要に応じて読み込んで利用すれば良い。従って、試料をセットする角度（ξ、ζ）、揺動角（θ_c）、配向角（δ、γ）が入力されると、それに応じて行列Rを計算し、展開係数$C_{\nu_m}^{m}$をファイルから読み込み、(3.52)-(3.54)を用いることによって偏光率の時間変化を計算することが出来る。

実際の計算例をFig. 3.4、Fig. 3.5に示す。これは、基板の角度を($\xi=20°$, $\zeta=0°$)、配向の方位角を$\gamma=0°$（すなわち分子は時間平均すると下向きに配向している）に固定し、揺動角は$\theta_c=15°$（Fig. 3.4）または$\theta_c=25°$（Fig. 3.5）、配向の極角を$\delta=20°$または$\delta=25°$とする計４通りの場合についての計算結果である。これを見ると２．５節で述べた通り、δが大きくなると揺動円錐がＸ軸、Ｚ軸か

ら遠ざかり、Y軸に近づくことにより、$M_X(t)$、$M_Z(t)$は小さく、$M_Y(t)$は大きくなることが理解できる。また、揺動角が大きくなると、偏光率のt=0とt=∞における値の差が大きくなり、緩和時間が長くなっていることが分かる。この結果から、2．5節で述べた偏光率の持つ物理的意味を確認することが出来る。

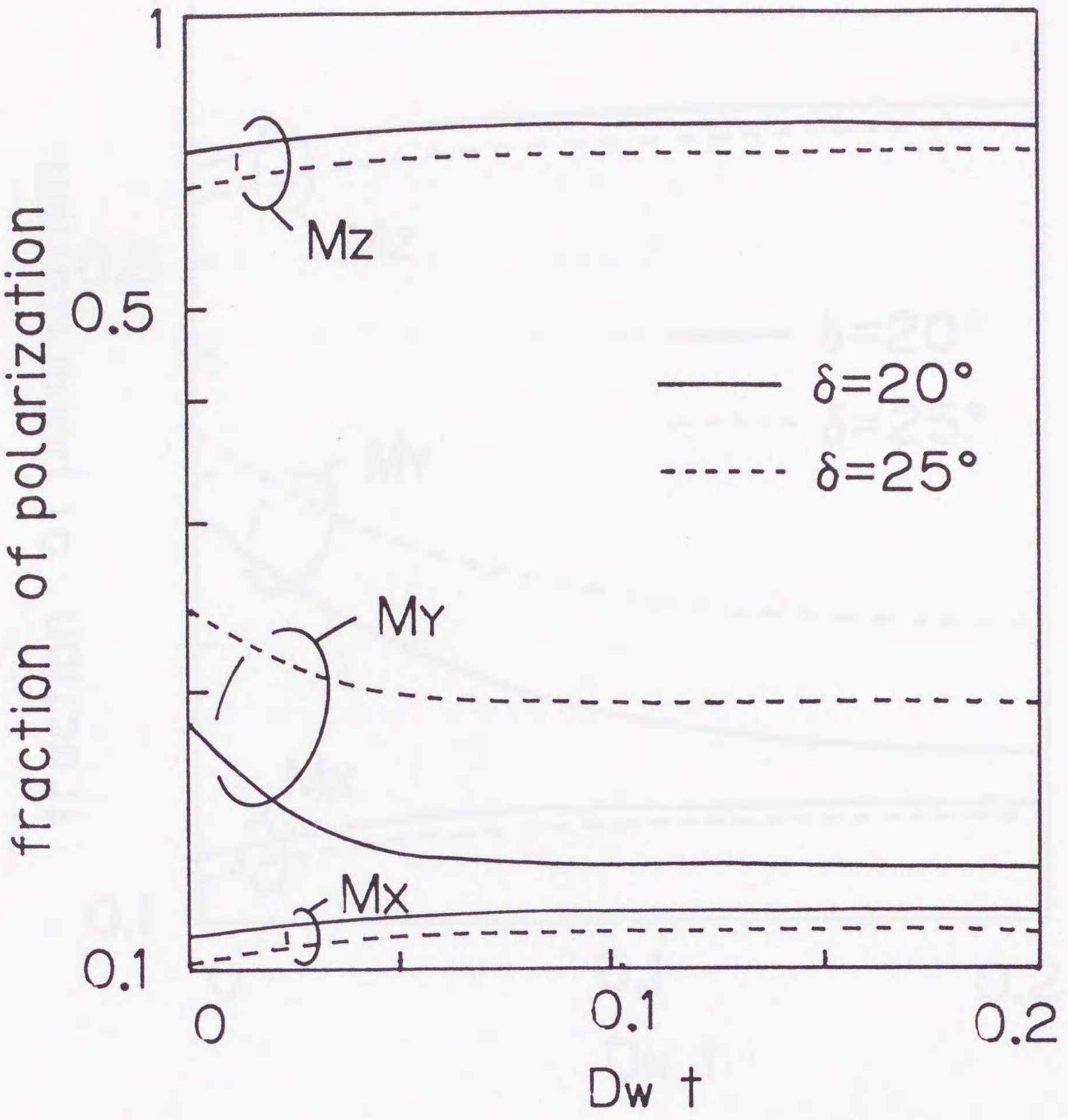


Fig. 3.4　偏光率の時間変化の計算結果

基板角度：$\xi = 20°$，　$\zeta = 0°$

励起軸　：Y軸

配向角　：$\delta = 20°, 25°$，　$\gamma = 0°$

揺動角　：$\theta_C = 15°$

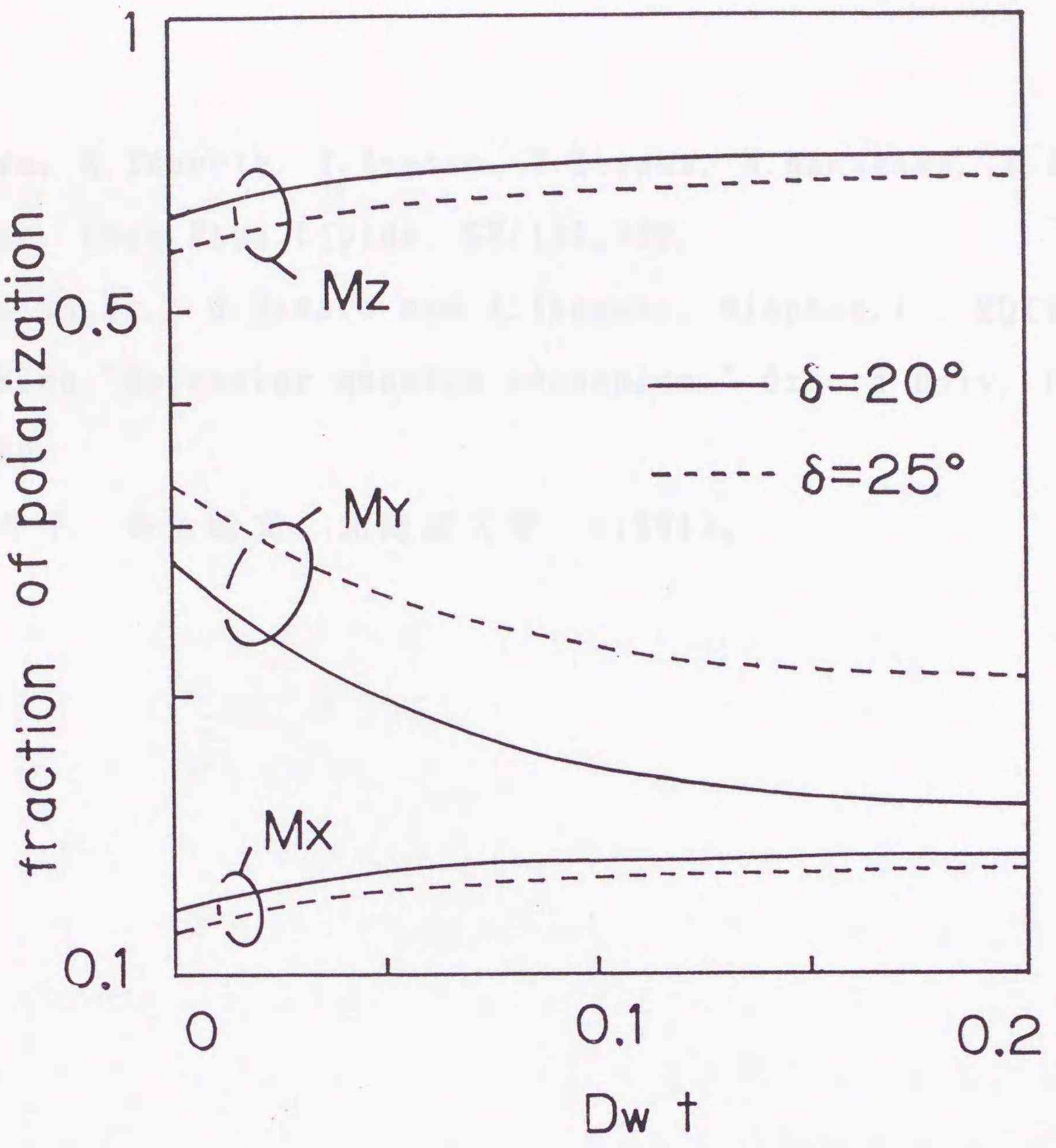


Fig.　3.5　偏光率の時間変化の計算結果

基板角度：ξ＝20°，　ζ＝0°

励起軸　：Y軸

配向角　：δ＝20°，25°，　γ＝0°

揺動角　：θ_C＝25°

【参考文献】

(1) N.Kimura, R.Tsuneta, T.Araiso, T.Koyama, N.Hasagawa, T.Ishii and K.Mukasa, Chem.Phys.Lipids, 57(1991)39.

(2) K.Kinosita,Jr., S.Kawaro and A.Ikegami, Biophys.J., 20(1977)289.

(3) P.W.Atkins,"Molecular quantum mechanics," Oxford Univ. Press, 1983, pp.58-80.

(4) 常田るり子、修士論文、北海道大学 (1991)。

第4章　時間分解蛍光偏光解消の測定法

4．1　時間相関単一光子計数法

偏光解消測定系をFig. 4.1、Fig. 4.2に示す。時間相関単一光子計数装置は偏光解消測定の中枢をなす部分であり、蛍光強度減衰の時間変化を直接的に測定する役割を有する。その原理は「1回の励起事象による光子1個の発光確率分布が、励起によって発する全光子の時間軸上での実際の強度分布になる」と云う概念に基づいており、以下のように説明される(1)。

光源から発せられた励起用パルス光の一部を石英板等でカットして、光電子増倍管で受光し、電気パルスを発生させる。このスタートトリガーパルスは、波高弁別器（ディスクリミネータ；discriminator）を通って時間電圧変換器（ＴＡＣ；time-to-amplitude converter）のスタート入力へ送られ、ＴＡＣのコンデンサー充電が開始される。一方、パルス光により励起された試料からは蛍光が放出されるが、励起事象ごとにせいぜい1個の光子だけが検出されるように、開口（aperture）を調節する。この光子により生じた信号でＴＡＣは充電を停止し、コンデンサーの蓄えられた電荷に比例した、すなわちスタートパルスとストップパルスの間の時間に比例した大きさのパルスを出力する。この出力パルスはアナログ－デジタル変換器（Ａ－Ｄ変換器）でデジタル量に変換され、データ記憶装置では、そのデジタル量に対応した番地（アドレス）に1カウントが蓄積される。これを繰り返し行い、記憶装置内のアドレス番号に対する計数のヒストグラムを作成すると、それが試料から発せられる蛍光の減衰曲線を表すことになる(2)（Fig. 4.3）。

単一光子計数法の特徴としては以下の事柄が上げられる(2)。

（1）光子を1個ずつ検出するために、あらゆる方法の中で最も感度が高い。

（2）時間分解能に優れている。

（3）光子を1個ずつ計数するデジタル測定であるため、ダイナミックレンジ

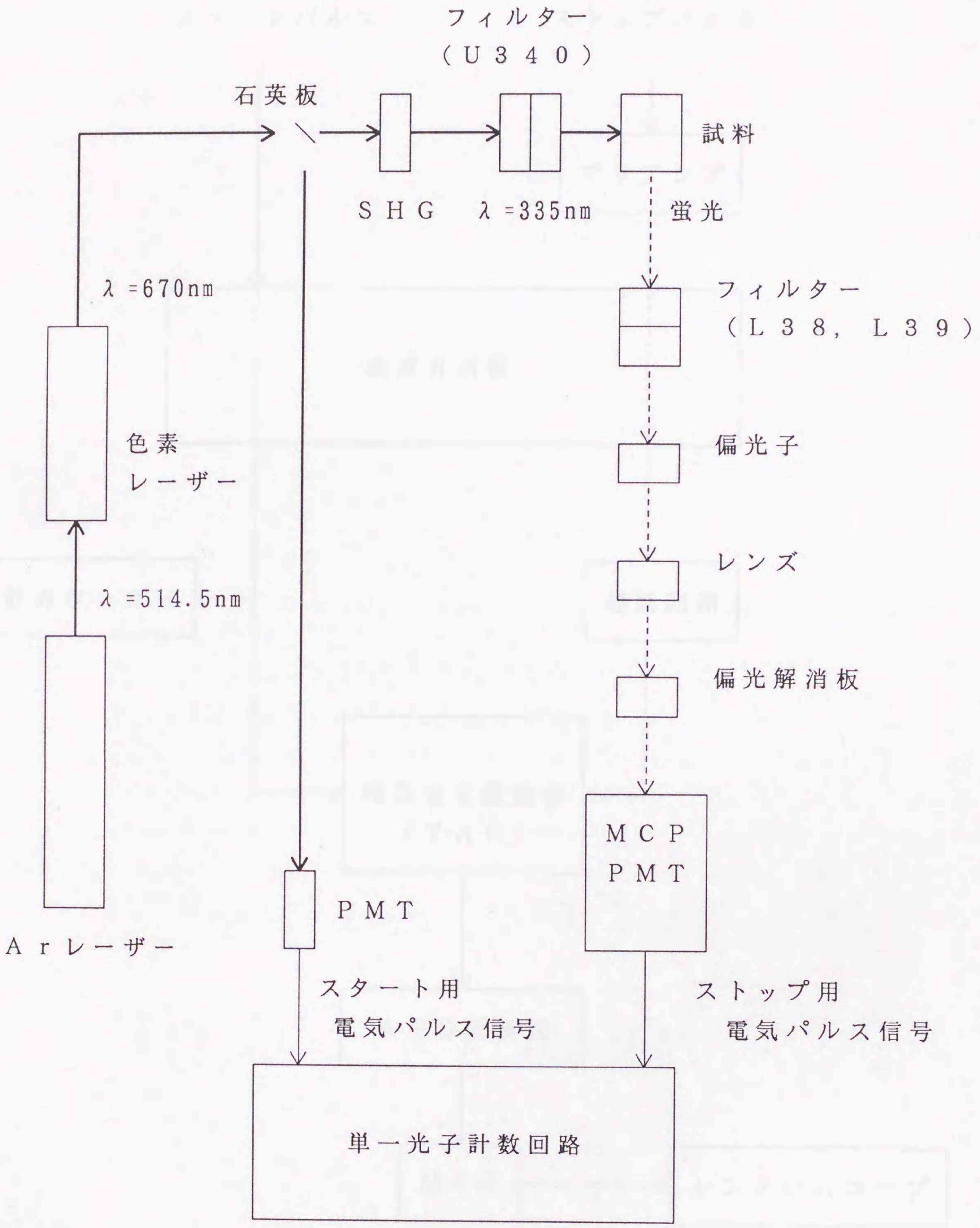


Fig. 4.1 時間分解蛍光偏光解消測定装置 光学系

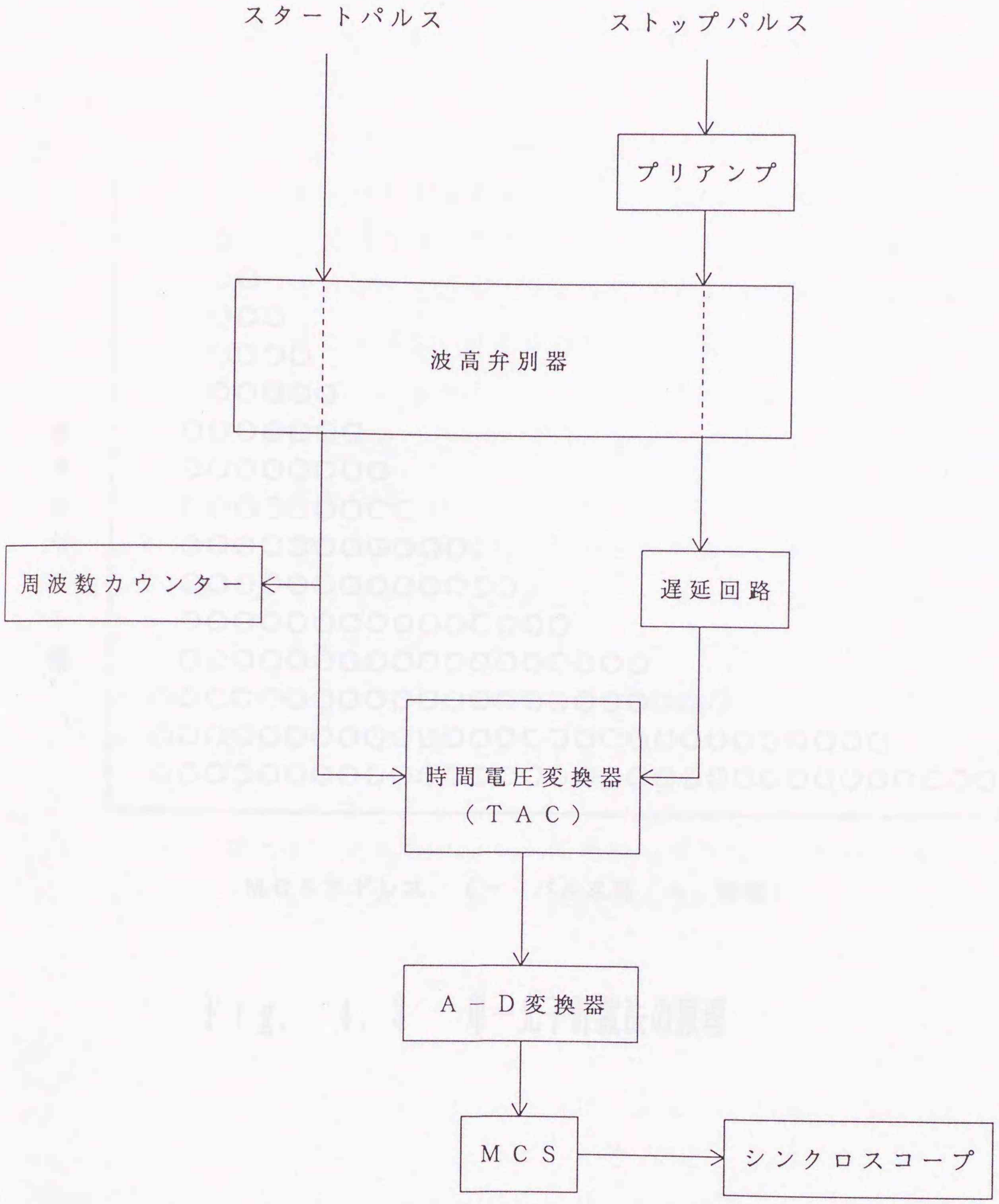


Fig.　4.2　時間分解蛍光偏光解消測定装置　電子回路系

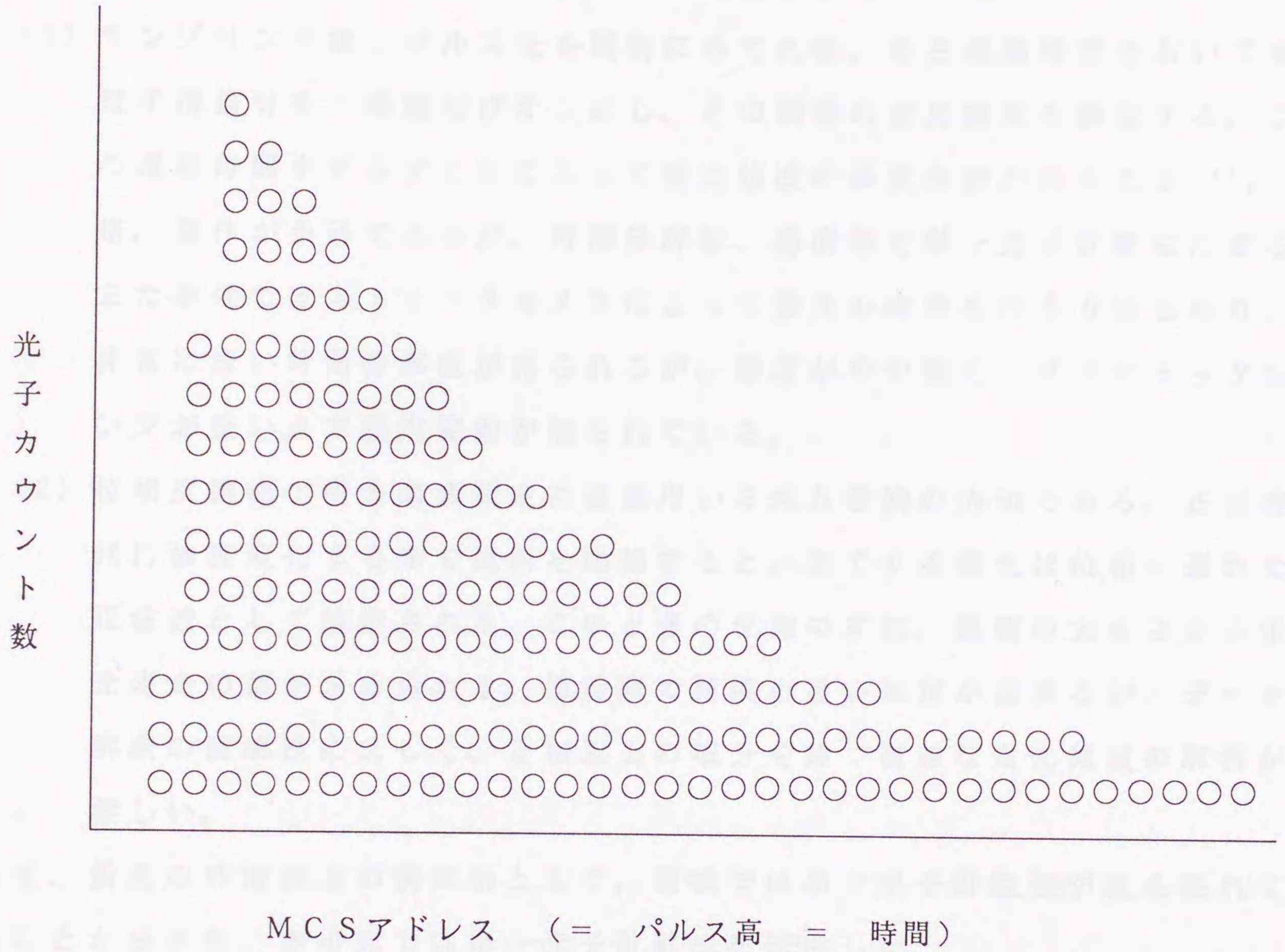


Fig. 4.3　単一光子計数法の原理

が広い。

(4) 繰り返し測定を基本とするため、測定に時間がかかる。

しかし(4)の欠点は近年、繰り返し周波数の高いパルスレーザーを用いることにより大きく改善された。

単一光子計数法に替わる方法としては次のものがある[2-4]。

(1) サンプリング法：パルス光を試料にあてた後、ある遅延時間をおいて光電子増倍管を一瞬間だけオンにし、その瞬間の蛍光強度を測定する。この遅延時間をずらすことによって蛍光強度の減衰曲線が得られる[1]。価格、操作が手軽であるが、時間分解能、感度等で単一光子計数法に劣る。また最近ではストリークカメラによって蛍光の検出を行う方法もあり、非常に短い時間分解能が得られるが、感度がやや低く、ダイナミックレンジが狭い点で測定範囲が限られている。

(2) 位相変調法：蛍光寿命測定に直接用いられた最初の方法である。正弦波状に強度変化する光で試料を励起すると、出てくる蛍光は位相の遅れた正弦波として観測される。このときの位相のずれ、振幅の大きさから蛍光寿命の値が求められる。短時間で精度の良い測定が出来るが、データ解釈の直感性に乏しく、2相以上の成分を持つ複雑な蛍光減衰の解析が難しい。

従って、蛍光の時間減衰の測定法として、現状では単一光子計数法が最も優れていることが分かり、本研究では単一光子計数法を採用した。

4．2 光源

本実験では励起光源としてアルゴン－色素レーザーを用いた。モードロッカー付きアルゴンレーザー（COHERENT, INNOVA 100-15）により、波長514.5nm、半値幅約120psecのパルス光を繰り返し周波数75.22MHz～75.26MHzで発生させる（レーザー出力は1.8～2.1W程度）。これをポンピング光として色素レーザー（COHERENT, Model 700）に入射、プリズムの調節により波長670nmで半値幅6psecのパルス光を

発振させ、さらにキャビティーダンパーの使用により、パルスの繰り返し周波数を1/10～1/7程度にする。この段階でのレーザー強度は約50～70mWである。なお、この波長は本実験で用いる蛍光プローブ、ＤＰＨプロピオン酸の吸収波長に対応して決められたものである。また、レーザー色素にはＤＣＭ（EXCITON製）を用いた。

4．3　光学系

色素レーザーの出力光をＳＨＧに通し、半分の波長（λ=335nm）を持つ第二次高調波を発生させる。ＳＨＧとしてはBBO（β-BaB_2O_4）を用いた。この光を２枚の光学フィルター（HOYA, U340）を通して、元の波長670nmの光をカットし、335nmの紫外光のみを取り出す。２枚重ねて用いたのは、１枚だけではカットが充分出来ないためである。このようにして取り出された紫外パルス光は縦に（鉛直方向に）偏光した状態で、励起光として試料に照射される。このとき励起光のスポットは約5mm×2mmの長方形の形になっている。

励起光の入射方向と直角をなす方向に、試料から発せられた蛍光を受光するための光学系をセットする。まずフィルター（HOYA, L-39,L-38）を置くことにより、基板等で反射、散乱された335nmの光をカットし、蛍光（本実験ではＤＰＨ－プロピオン酸を用いているため、蛍光波長は430nm）のみを取り出す。ここで使用したフィルターの替わりにL-42を用いても良いが、これは紫外光を当てるとそれ自身蛍光を発するので使用に際しては注意が必要である。フィルターの後ろには偏光子（ポラロイド HNP'B 偏光板）を置く。これを回転するにより、蛍光強度の縦偏光成分（$I_Y(t)$）と横成分（$I_Z(t)$）を交互に測定していく。

その後ろにはレンズを置き、マイクロチャンネルプレート（ＭＣＰ；Micro Channel Plate）内臓型光電子増倍管（ＰＭＴ；HAMAMATSU PHOTONICS, R2809U-07）に蛍光を集光する。ＭＣＰは直径6μmのチャンネルと呼ばれるガラスキャピラリーを何百万本も束ねた二次電子増幅器であり、それを何段か（本実験で用いたものは２段）重ねたものが、このＰＭＴである[5]。ＭＣＰ－ＰＭＴは従来の光電子

増倍管に比べて、高速かつ走行時間分布が非常に狭いので、時間分解能が極めて高く、また比較的高い利得を得ることが出来る[5]。

また、レンズとＰＭＴの間には偏光解消板を置き、光検出系の偏光方向に対する感度の差を取り除く。従っていわゆるＧ因子の補正はここでは不必要となる[6]。

4．4　回路系[7]

励起パルスの一部は、単一光子計数回路のトリガー信号として用いるために石英板で反射され、高速フォトダイオード（HAMAMATSU PHOTONICS, S1188）で電気パルスに変換された後、単一光子計数回路へ入力される。このパルスは、波高弁別器（Constant Fraction Discriminator; TENNELEC, TC455）を通すことによって一定の波高のパルスに整形されてから、遅延回路（HAMAMATSU PHOTONICS, C1097）を通り、ＴＡＣ（EG&G ORTEC, Model 457）に入力される。この時点でＴＡＣは定電流源によるコンデンサーの充電を開始する。一方、ＰＭＴで蛍光光子から電気パルスに変換されたストップ用信号は、プリアンプ（NF ELECTRONIC INSTRUMENTS, Wide Band Preamplifier, Model BX-31）で増幅された後に波高弁別器（同上）に入力される。この波高弁別器の出力端子の一つには周波数カウンター（IWATSU ELECTRONIC, FC-8841）が接続され、蛍光強度（蛍光光子数）がモニターされる。別の端子から出力されたパルスは上記のＴＡＣに入力され、その時点でＴＡＣは充電を停止する。そして充電された電荷量、すなわちスタートパルスとストップパルスの間の時間差に比例する振幅のパルスを出力する。このパルスはＡ－Ｄ変換器（EG&G ORTEC, Model 800）でデジタル量に変換されてＭＣＰ（Malti Channel Plate）に記憶される。また、その記憶内容はシンクロスコープ（IWATSU ELECTRIC, SS-5702）に表示される。以上の測定はパーソナルコンピュータ（NEC, PC-9801 UV）によって制御されている。

ここで述べた方法は、トリガー信号をスタート用パルスに、蛍光信号をストップ用パルスとして利用する「順」様式であるが、励起光源の繰り返し数が高くなってくると、ＴＡＣが追随しきれなくなり、減衰曲線に歪が生じるようになる。

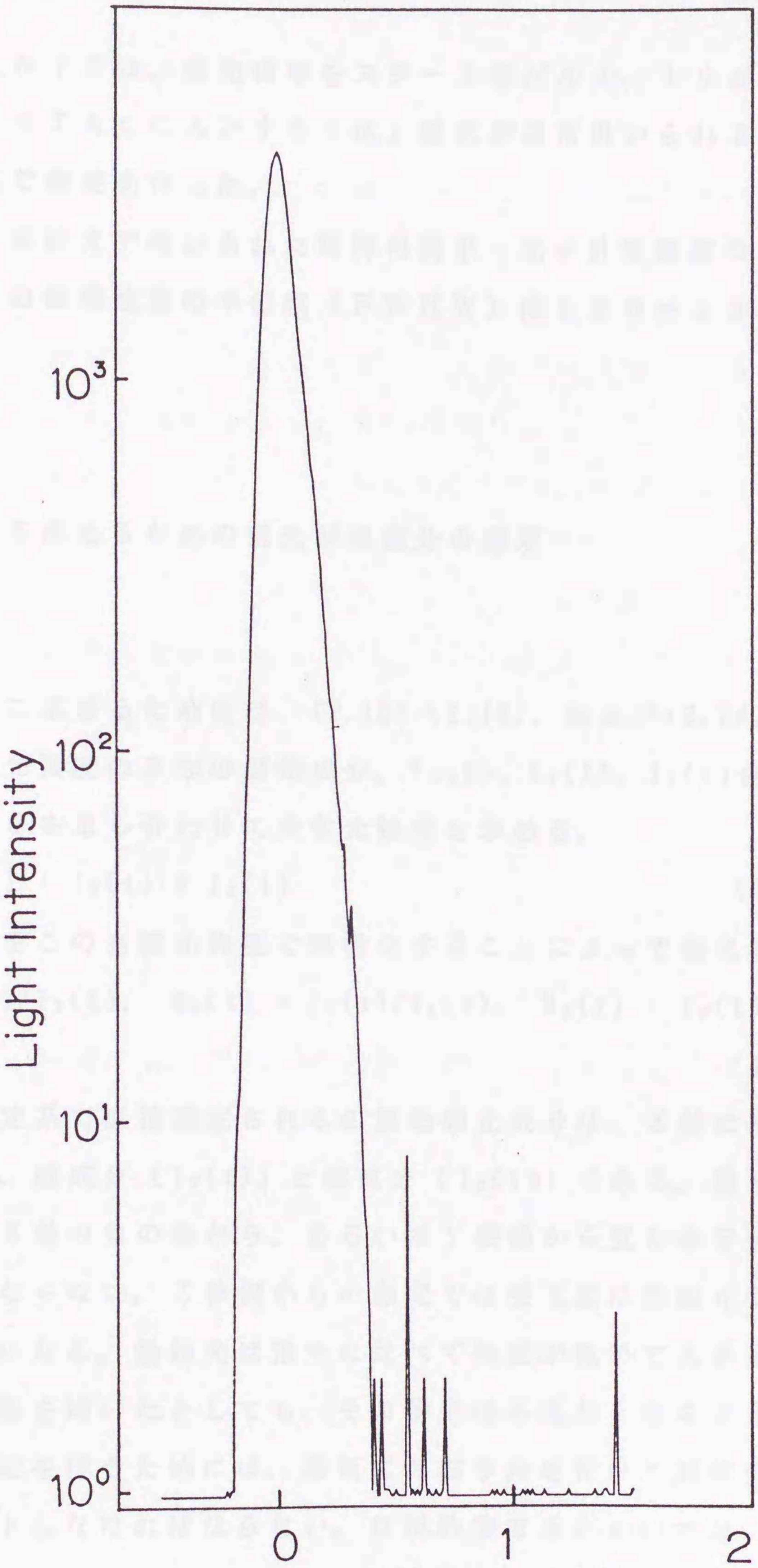


Fig. 4. 4 装置応答関数

そこでこの様な条件下では、蛍光信号をスタート用パルス、トリガー信号をストップ用パルスとしてＴＡＣに入力する「逆」様式が通常用いられる[1]。本実験においてもこの様式で測定を行った。

以上で述べた、本研究で用いられた時間相関単一光子計数装置の応答関数、すなわち励起パルスの観測波形の半値幅（ＦＷＨＷ）は１２０～１５０ｐｓである（Fig. 4.4）。

４．５　偏光率を求めるための蛍光偏光成分の測定

偏光率を実験的に求めるためには、(2.16)-(2.18)、および(2.24)-(2.26)から分かるように、蛍光強度の３つの偏光成分、$I_X(t)$、$I_Y(t)$、$I_Z(t)$を測定しなければならない。これらを足し合わせて全蛍光強度を求める。

$$I_T(t) = I_X(t) + I_Y(t) + I_Z(t) \quad (4.1)$$

そして各偏光成分をこの全蛍光強度で規格化することによって偏光率が得られる。

$$M_X(t) = I_X(t)/I_T(t), \quad M_Y(t) = I_Y(t)/I_T(t), \quad M_Z(t) = I_Z(t)/I_T(t) \quad (4.2)$$

ただし従来の測定系で直接測定されるの蛍光偏光成分は、Ｚ軸に沿って励起光を入射したときの、縦成分（$I_Y(t)$）と横成分（$I_Z(t)$）である。残りの成分$I_X(t)$を得るためには、Ｚ軸の負の側から、あるいはＹ軸側から見た水平偏光成分の測定を行わなくてはならない。Ｚ軸側からの測定では受光器に励起光が蛍光と同時に入って来ることになる。励起光は蛍光に比べて強度が極めて大きいため、フィルターまたは分光器を用いたとしても、その除去は不充分とならざるを得ない。またＹ軸側から測定を行うためには、基板にあおり角を付けて試料面が多少上を向いた状態でセットしなければならない。巨視的等方系においては、Ｙ軸は励起分子の分布の対称軸となっている。一方でＬＢ膜等の平面配向系の場合にはＸ、Ｙ、Ｚ各軸は分子の配向に関して特別な意味を持たないが、偏光率が持つ物理的意味の明確さ、直感性を増すためには、これら３つの軸の内いずれかが配向軸に出来るだけ近寄っていることが望ましい。通常、配向軸は基板の法線方向に近い

と予想されるので、まずはあおり角を付けずに法線をX軸またはZ軸に寄せた状態で測定を行うべきである。従ってY軸側からの測定も適当とは云えない。また両者とも、その測定に際しては同等の受光器が2組必要であるため、測定系が複雑になってしまうと云う欠点もある。

そこで本研究では、従来と同じく装置を配置した測定系を用いて、基板の角度を置き換えて二度の測定を行うことにより、二方向からの測定と同等の測定が可能であることを示し、それを実行した。その原理は以下の通りである。

まず、基板の角度を$\xi=\xi_0$、$\zeta=\zeta_0$として$I_Y(t)$と$I_Z(t)$の測定を行う。次に、基板を縦軸を中心に、角度$\pi/2-\xi_0$だけ回転し、さらに上下を逆さまにする。すなわち、角度を$\xi=\xi'=\pi/2-\xi_0$、$\zeta=\zeta_0+\pi$にセットして蛍光強度の測定を行う。このとき測定された偏光蛍光強度を$I_Y'(t)$、$I_Z'(t)$と表すことにする。

第一の測定の際、基板上に固定された座標系(X_S,Y_S,Z_S)と実験室系に固定された座標系(X,Y,Z)との間の関係を表す座標変換行列Gは、(2.14)より

$$G=\begin{bmatrix}\cos\xi_0\cos\zeta_0 & \sin\zeta_0 & -\sin\xi_0\cos\zeta_0\\ -\cos\xi_0\sin\zeta_0 & \cos\zeta_0 & \sin\xi_0\sin\zeta_0\\ \sin\xi_0 & 0 & \cos\xi_0\end{bmatrix} \qquad (4.3)$$

となる。一方、第二の測定の際の、この変換行列をG'とすると、それは次のように表される。

$$G'=\begin{bmatrix}-\sin\xi_0\cos\zeta_0 & -\sin\zeta_0 & \cos\xi_0\cos\zeta_0\\ \sin\xi_0\sin\zeta_0 & -\cos\zeta_0 & -\cos\xi_0\sin\zeta_0\\ \cos\xi_0 & 0 & \sin\xi_0\end{bmatrix} \qquad (4.4)$$

GとG'を比べると、

$$g'_{i1} = g_{i3} \qquad (4.5)$$

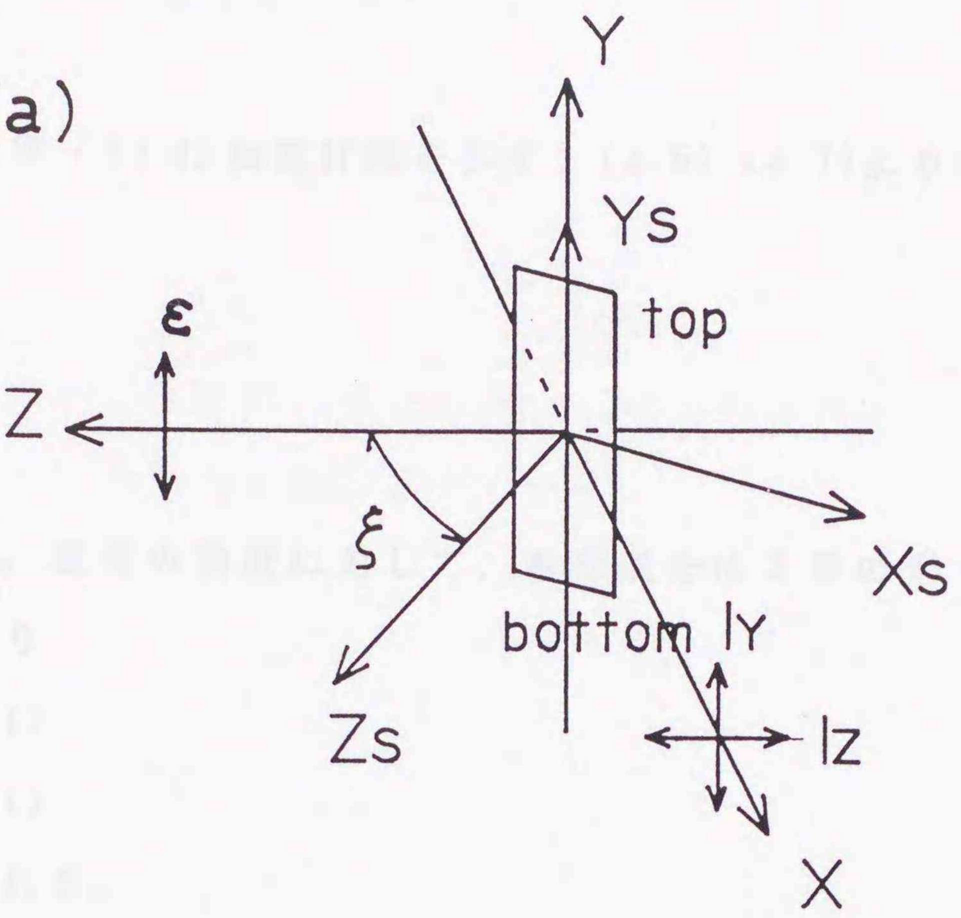
$$g'_{i2} = -g_{i2} \qquad (4.6)$$

$$g'_{i3} = g_{i1} \qquad (4.7)$$

$$(i = 1,2,3)$$

となっていることが分かる。ここでg_{ij}とg'_{ij}はそれぞれGとG'の成分を表している。(2.12)より

(a)



(b)

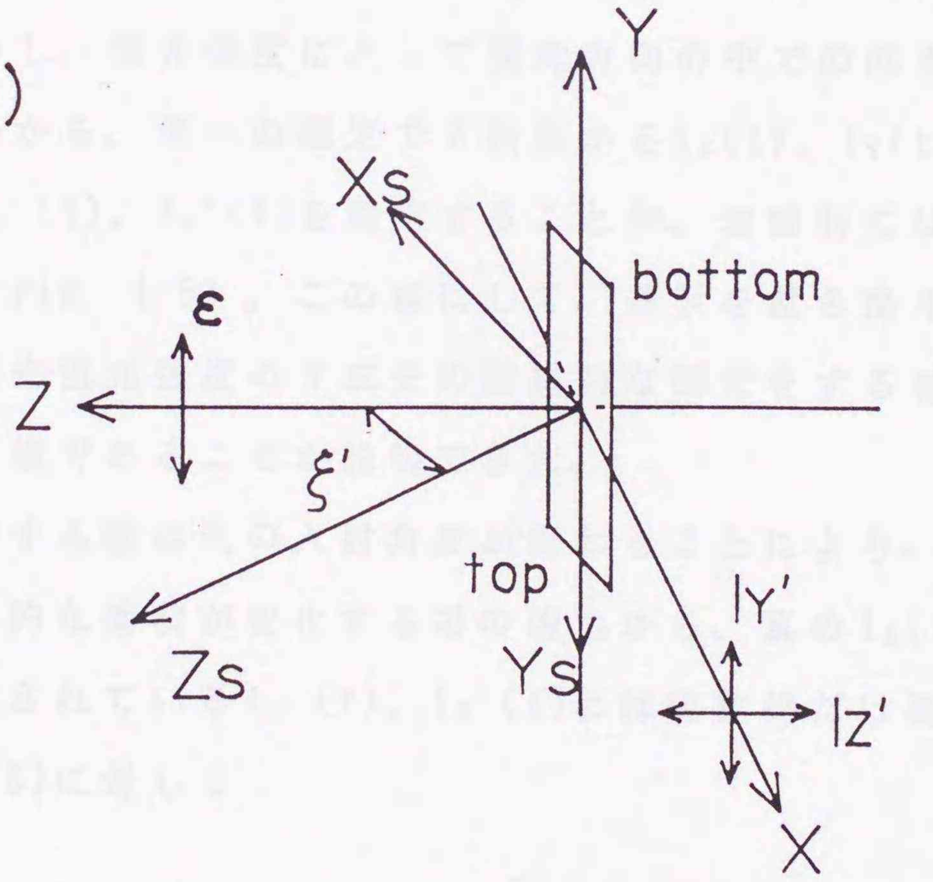


Fig. 4.5 基板の置き換えによる
蛍光偏光成分測定

$$X = G^T X_S \quad (4.8)$$

$$X' = G'^T X_S \quad (4.9)$$

であるから、（添字「T」は転置行列を示す）(4.5)-(4.7)より各座標成分の間には

$$X = Z' \quad (4.10)$$

$$Y = -Y' \quad (4.11)$$

$$Z = X' \quad (4.12)$$

の関係が成り立つ。蛍光の強度に対して、座標成分は2乗の形で寄与するので、(4.10)、(4.11)より

$$I_X(t) = I_Z'(t) \quad (4.13)$$

$$I_Y(t) = I_Y'(t) \quad (4.14)$$

となることが導かれる。

これは言い換えると、第二の測定において受光器側（X軸側）から見た基板（および基板上に存在する全ての物を含めて）は、第一の測定においてZ軸側から見た場合と、上下が逆さまになっていることを除いては全く同じに見えると云うことである。しかし、蛍光強度にとって偏光方向の中での向き（ここでは上か下か）の区別はないから、第一の測定でZ軸側から$I_X(t)$、$I_Y(t)$を測定することと、第二の測定で$I_Z'(t)$、$I_Y'(t)$を測定することが、理論的には全く同等であることが理解出来る（Fig. 4.5）。この様にして、基板を置き換えて二度の測定を行うことにより、偏光蛍光強度の3成分の直接的な測定をする替わりに、それと全く同等な測定が可能であることが説明できた。

ただし、基板に対する励起光の入射角度が変わることにより、励起光のスポットの試料面での実効的な面積が変化する等の理由から、真の$I_X(t)$、$I_Y(t)$とそれと同等であるとみなされている$I_Z'(t)$、$I_Y'(t)$とは定数倍だけ異なる場合がある。そこで実際には(4.13)に対して

$$I_X(t) = \frac{I_Y(t)}{I_Y'(t)} I_Z'(t) \quad (4.15)$$

として補正を行う必要がある。

更に付け加えると、蛍光測定を行う際、除去しきれなかった基板、周囲の装置等からの蛍光、散乱や暗電流の影響を取り除くために、バックグランドを引くこ

とが必要である。例えば縦の蛍光偏光成分の場合、まずＬＢ膜試料に励起光を照射し、その測定の結果を$I_Y{}^0(t)$とする。次に基板上でＬＢ膜が累積されていない部分に励起光を当て、同様に測定を行ってバックグランド$B_Y(t)$を得る。そして両者の差

$$I_Y(t) = I_Y{}^0(t) - B_Y(t) \qquad (4.16)$$

を計算することにより、ＬＢ膜からのみの蛍光減衰曲線が求められる。もちろんX、Ｚ成分についても同様の処理が必要である。

【参考文献】

(1) D.V. O'Connor, D. Phillips, 「ナノ・ピコ秒の螢光測定と解析法」(平山鋭、原清明訳)、学会出版センター、1988、pp.33-51。

(2) 木下一彦、「螢光測定　生物科学への応用」(木下一彦、御橋廣眞編)、学会出版センター、1983、pp.99-160。

(3) D.V. O'Connor, D. Phillips, 「ナノ・ピコ秒の螢光測定と解析法」(平山鋭、原清明訳)、学会出版センター、1988、pp.1-31。

(4) J.R. Lakowicz, "Principle of fluorescence spectroscopy," Plenum Press, New York, 1983, pp.52-95.

(5) D.V. O'Connor, D. Phillips, 「ナノ・ピコ秒の螢光測定と解析法」(平山鋭、原清明訳)、学会出版センター、1988、pp.99-124。

(6) 神山勉、「螢光測定　生物科学への応用」(木下一彦、御橋廣眞編)、学会出版センター、1983、pp.45-98。

(7) D.V. O'Connor, D. Phillips, 「ナノ・ピコ秒の螢光測定と解析法」(平山鋭、原清明訳)、学会出版センター、1988、pp.125-151。

第5章　ＬＢ法による製膜

５．１　ＬＢ膜製膜の原理

ＬＢ膜製膜装置の外観をFig. 5.1に示す。ＬＢ膜の製膜は以下のように行われる。

(1)　膜を形成する物質を有機溶媒に溶かす。この膜物質は水になじみやすい親水基と、逆に水になじみ難い疎水基を併せ持つ両親媒性の物質でなければならない。膜形成に適している親水基としては、極性の強い順に

カルボキシル基	-$COOH$
アルコール	-CH_2OH
アミン	-NH_2
アルデヒド	-CHO
ケトン	-CO-
エステル	-$COOCH_3$

が上げられる[1,2]。一方疎水基としては

フッ化炭素
飽和炭化水素
不飽和炭化水素
芳香族炭化水素

がある[2]。

また、溶媒として一般的に用いられるものにはクロロホルム、四塩化炭素、ヘキサン、ベンゼン等があり、水に対して不溶で、揮発性の高いものが望ましい。

(2)　トラフ（水槽）に下層水を張り、その水面上に(1)で作られた膜溶液をマイクロシリンジ等で静かに展開する。下層水には純水、あるいは純水に金属塩を溶解させたものが用いられる。この金属塩は膜の剛性を調整し、基板に累

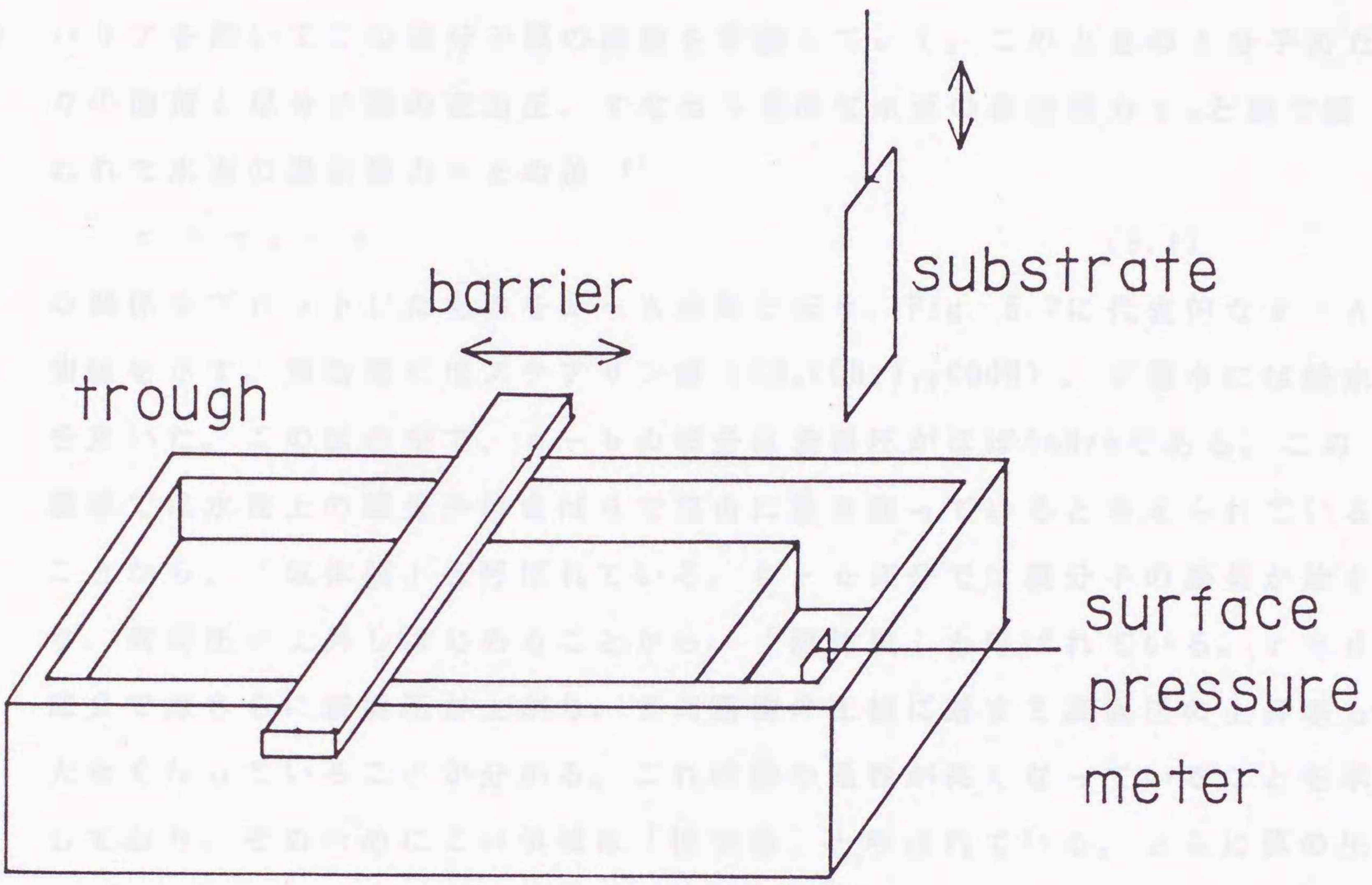


Fig.　5. 1　LB膜製膜装置

積しやすくする役割を持っている[3]。

(3) 水面上に展開された溶液は、有機溶媒が蒸発することによって、膜分子の親水基が下層水側に、疎水基が気相側に向いた形で水面全体に広がり、分子一層分の膜、すなわち単分子膜を形成する。

(4) バリアを用いてこの単分子膜の面積を圧縮していく。このときの1分子あたりの面積と単分子膜の表面圧、すなわち清浄な水面の表面張力γ_0と膜で覆われた水面の表面張力γとの差[2]

$$\pi = \gamma_0 - \gamma \qquad (5.1)$$

の関係をプロットしたものをπ－A曲線と云う。Fig. 5.2に代表的なπ－A曲線を示す。膜物質にはステアリン酸（$CH_3(CH_2)_{16}COOH$）、下層水には純水を用いた。この図の中で、a－bの部分は表面圧がほぼ0mN/mである。この領域では水面上の膜分子はまばらで自由に動き回っていると考えられていることから、「気体膜」と呼ばれている。b－c部分では膜分子の凝集が始まり、表面圧が上昇しはじめることから、「液体膜」と呼ばれている。c－d部分ではさらに表面圧が上がり、また面積の圧縮に対する表面圧の上昇率も大きくなっていることが分かる。これは膜の剛性が高くなっていることを示しており、そのためにこの領域は「固体膜」と呼ばれている。さらに膜の圧縮を進めd点を過ぎると、表面圧は急激に減少しはじめる。これは単分子膜が壊れたためであり、崩壊膜と呼ばれる。以上のように、水面上単分子膜は簡単には、気体膜、液体膜、固体膜、崩壊膜の各領域に分類することが出来る[2]。ただし膜分子や測定条件により、液体膜相がさらにいくつかの相に分離する場合、あるいは逆に液体膜相がなくなる場合もある[2]。

また、最近の位相差顕微鏡を用いた研究によると、水面上単分子膜は展開された直後の気体膜の状態で、すでにドメインすなわち部分的な固体膜を形成しており、膜が圧縮されるにつれてそれらのドメインが融合する様子が観察されている[4,5]。この研究は、上記のπ－A曲線の解釈について再検討を行う必要があることを示唆している。

(5) 基板上への膜の累積は、水面上単分子膜を適当な表面圧まで圧縮した状態（通常は固体膜の中程）で行う。

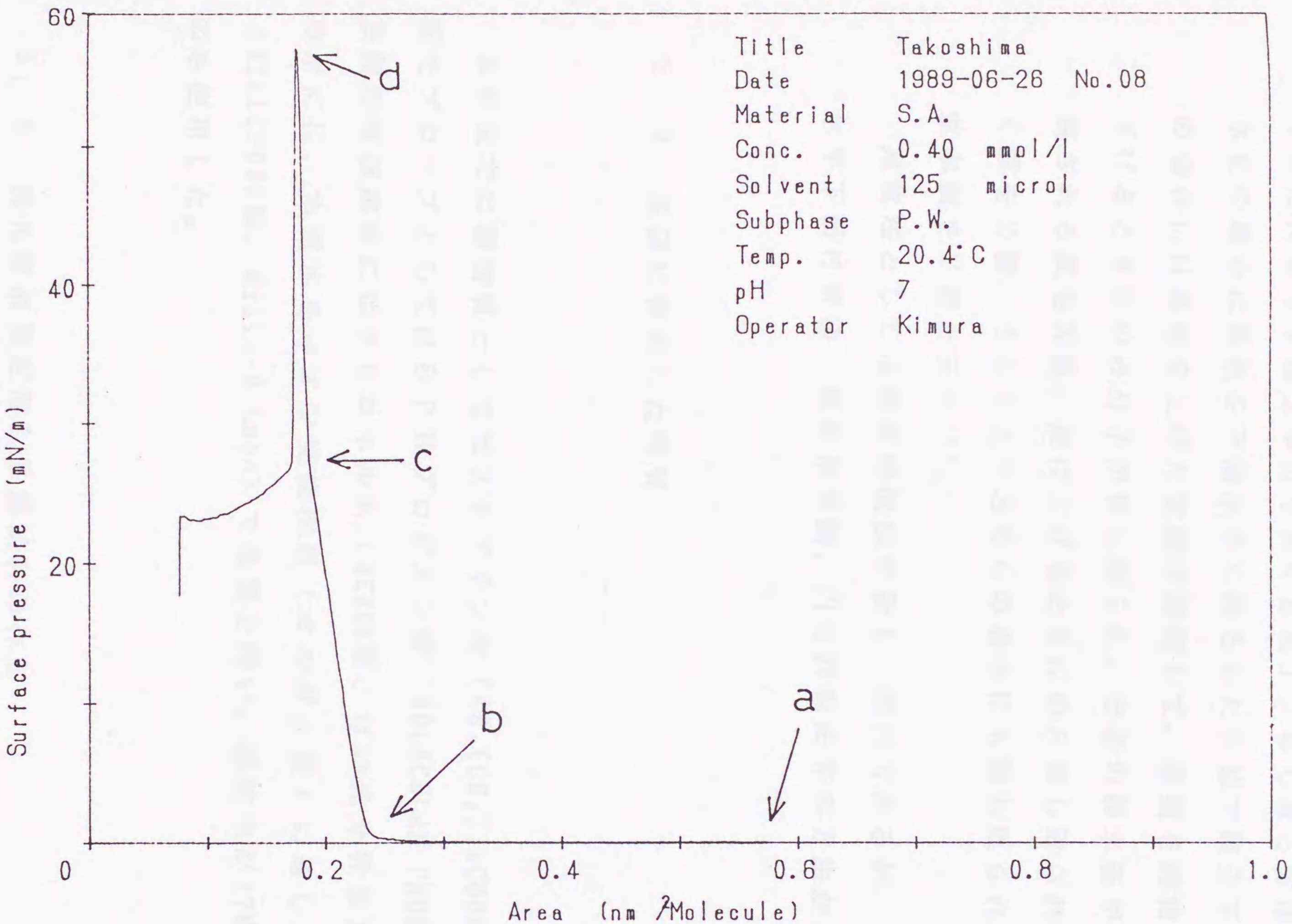


Fig. 5. 2 純水上でのステアリン酸単分子膜のπ－A曲線

垂直浸漬法は基板を垂直に立て、水面を横切って浸漬と引き上げを繰り返すことにより水面上単分子膜を基板上に移し取る方法である。基板表面が親水性の場合は基板を下層水中に降ろした状態で膜分子溶液を展開し、疎水性の場合には基板を上げた状態で展開して、累積を開始する。その際、基板を下げるときにのみ分子が移し取られ、分子の疎水基が必ず基板側を向いて累積される膜をＸ膜、逆に上げるときにのみ移し取られ、親水基が基板側に向く膜をＺ膜、そして上下どちらの場合にも移し取られ、分子の向きが交互に並ぶ膜をＹ膜と云う(6)。

累積法としては垂直浸漬法が最も一般的であるが、この他に水平付着法、水平下面付着法、傾斜累積法、円筒回転法等の方法がある(3)。

５．２　製膜に使用した物質

本研究では膜物質としてはステアリン酸（$CH_3(CH_2)_{16}COOH$；キシダ化学製）を、蛍光プローブとしてはＤＰＨプロピオン酸（MOLECULAR PROBES製）を使用した。展開用有機溶媒にはクロロホルム（MERCK製、けい光分析用）を用いた。下層水用の水には、水道水をイオン交換樹脂（オルガノ製）に通し、さらに超純水装置（MILLIPORE製、Milli-Q Labo）で処理を行い、抵抗率が17MΩ-cm以上になったものを使用した。

５．３　偏光解消測定用ＬＢ膜試料の作製

展開溶液にはステアリン酸のクロロホルム溶液を用い、これに蛍光プローブとしてＤＰＨプロピオン酸を混入した。プローブの割合はモル比で1%とし、ステアリン酸の溶液の濃度は0.4mMとした。

下層水としては塩化カドミウム（$CdCl_2$）の水溶液、0.4mMを用いた。これに少

量の炭酸水素ナトリウム（$NaHCO_3$）を添加し（濃度は18μM程度）、pHを約6.3に調整した。pHがこの値より低い場合、ステアリン酸の下層水への解け込みが増し、特に6.0より小さくなると安定な水面上単分子膜が形成できなくなる。逆にpHが大きい場合は膜が硬くなり、膜の移し取りがスムーズに出来なくなるため、累積比が悪化する。

累積に使用する基板には、蛍光を発しない透明溶融石英板（マツナミガラス製）を用いた。サイズは幅2.65cm、長さ7.6cm、厚さ0.1cmである。これをアセトン中で２０分程度超音波洗浄した後、一昼夜アルカリアルコールに漬け、水で洗浄してから累積に用いた。この処理によって基板表面は清浄な親水性表面となる。

本研究で使用したＬＢ膜作製装置（協和界面科学製）のトラフのサイズは幅7cm、長さ30cmである。そこに下層水を極くわずか水面が盛り上がる程度に満たし、基板を下層水中に浸した状態にセットしておく。浸す部分は基板の下部3cmとした。その後展開溶液をマイクロシリンジで滴下する。滴下量は120μlとした。滴下後５分程度待ってから、15cm^2/minの速度で水面上単分子膜の圧縮を開始する。圧縮開始後、表面圧があらかじめセットして置いた累積表面圧に達した時点で、バリア速度を15cm^2/minから7cm^2/minに下げる。ここで水面上単分子膜の自然消滅率測定のために５分間待ってから[7]、基板の引き上げ速度0.5cm/minで、１層の膜の累積を行った。以上の過程は全て室温（20°C）で行った。なおこの水面上単分子膜のπ－Ａ曲線をFig. 5.3に示す。

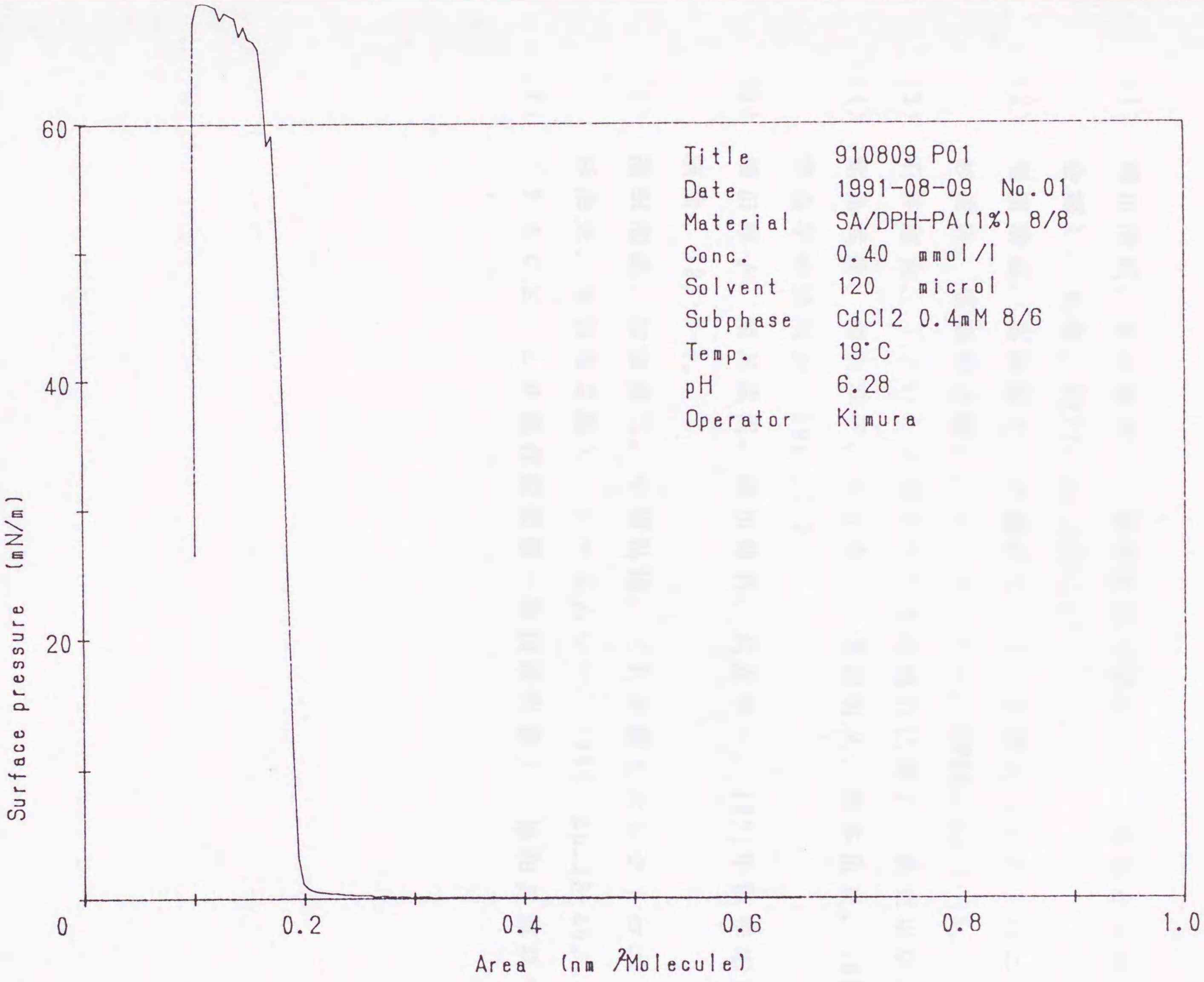


Fig. 5. 3　ステアリン酸+DPHプロピオン酸(1%)単分子膜の
π－A曲線

【参考文献】

(1)　福田清成、石井淑夫、「新実験化学講座１６　界面とコロイド」（日本化学会編）、丸善、1977、pp.439-516。

(2)　福田清成、石井淑夫、加藤貞二、「ＬＢ膜とエレクトロニクス」（福田清成、杉道夫、雀部博之編）、シーエムシー、1986、pp.1-15。

(3)　石井淑夫、「よいＬＢ膜をつくる実践的技術」、共立出版、1989。

(4)　蛸島武尚、増田厚子、武笠幸一、荒磯恒久、松本伍良、1990年秋季応用物理学会学術講演会、29a-ZC-2。

(5)　増田厚子、蛸島武尚、津田健吾、武笠幸一、1991年秋季応用物理学会学術講演会、12p-R-4。

(6)　福田清成、加藤貞二、中原弘雄、「ＬＢ膜とエレクトロニクス」（福田清成、杉道夫、雀部博之編）、シーエムシー、1986、pp.33-46。

(7)　「ＦＡＣＥ　ＬＢ膜作製装置　取扱説明書」、協和界面科学。

第6章　時間分解蛍光偏光解消法によるＬＢ膜の評価および考察

６．１　偏光率の測定

ＤＰＨ－プロピオン酸を蛍光プローブとして含む（含有率 1モル%）ステアリン酸を、表面圧25mN/mで累積したＬＢ膜について時間分解偏光解消測定を行った。このＬＢ膜を縦に置き（$\zeta=0°$）、縦（Ｙ軸）方向に励起したパルス光を入射角80°（$\xi=80°$）で照射した場合の測定結果がFig. 6.1である。

なお、図中の滑らかな曲線は、最小二乗法標準プログラム　ＳＡＬＳ[1,2]を用いてフィッティングを行った結果である。モデル関数としては

$$M_X(t) = (M_{X0} - M_{X\infty})\exp(-t/\sigma_X) + M_{X\infty} \qquad (6.1)$$

（Ｙ，Ｚについても同様）

を仮定した。解析の結果、各フィッティングパラメータの値として以下の値が得られた。

$M_{X0} = 0.372$　　$M_{X\infty} = 0.748$　　$\sigma_X = 6.81$ns

$M_{Y0} = 0.429$　　$M_{Y\infty} = 0.105$　　$\sigma_Y = 8.43$ns

$M_{Z0} = 0.192$　　$M_{Z\infty} = 0.091$　　$\sigma_Z = 9.78$ns

また偏光率のフィッティング値と実測値の重み付き残差をFig. 6.2に示した。

Fig. 6.1からは、以下のことを定性的に読みとることが出来る。

・$M_{X\infty}$が$M_{Y\infty}$、$M_{Z\infty}$に比べてかなり大きな値となっており、分子が平均してＸ軸に近い方向に配向していることが分かる。$\xi=80°$の場合、Ｘ軸と基板法線はかなり近い方向を向いているので、分子はほぼ基板法線方向に配向していると云える。

・$M_{Y\infty}$と$M_{Z\infty}$はほぼ同じ値であるが、$M_{Y\infty}$の方がやや大きい。このことは、分子が基板の縦方向に多少傾いて配向していることを意味している。

・偏光率の緩和時間はσ_X=6.8ns、σ_Y=8.4ns、σ_Z=9.8nsとなっていることから、

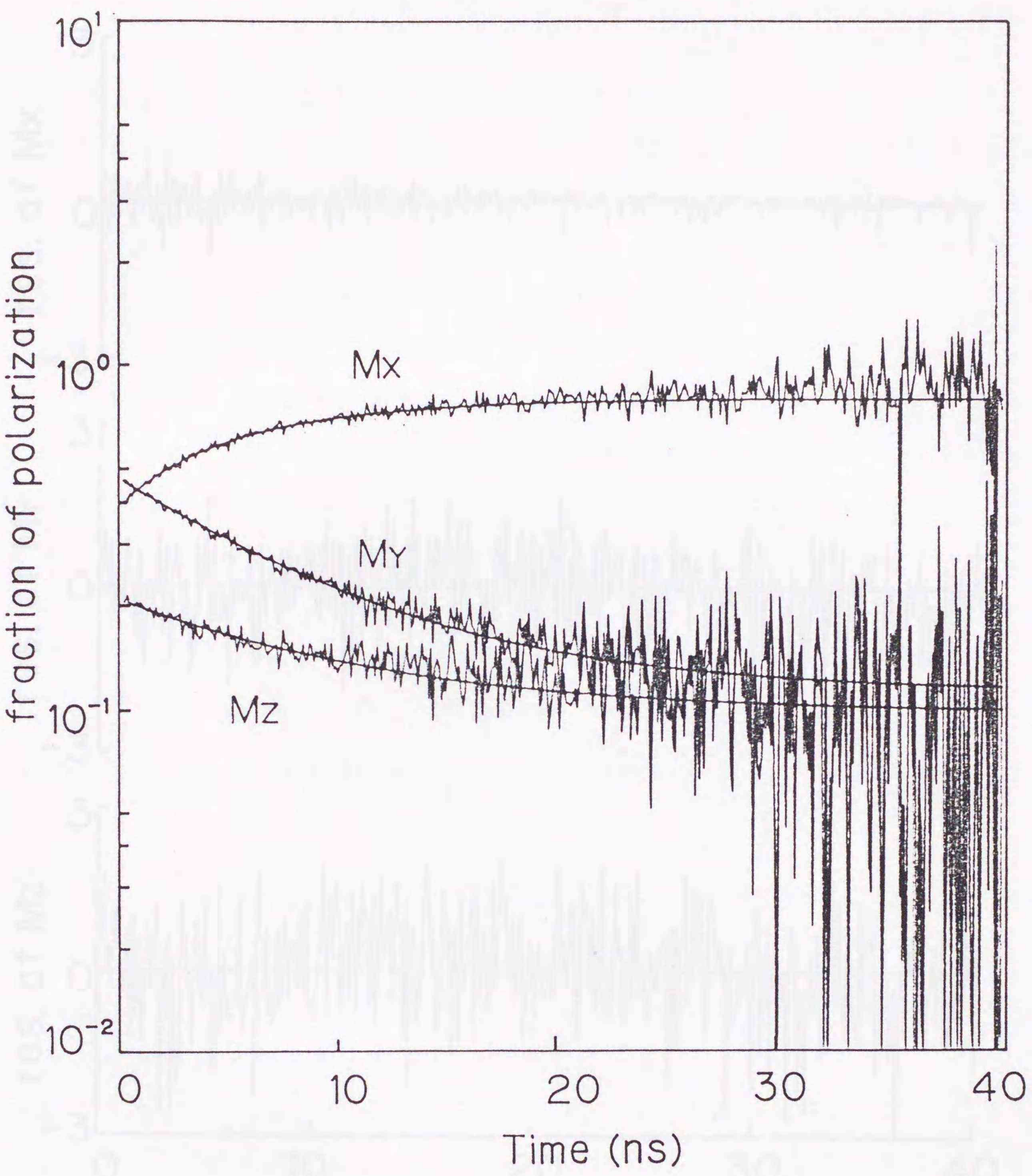


Fig. 6.1 ステアリン酸＋DPHプロピオン酸（1%）LB膜の偏光率測定例
（基板角度：ξ＝80°，ζ＝0°　励起軸：Y軸）

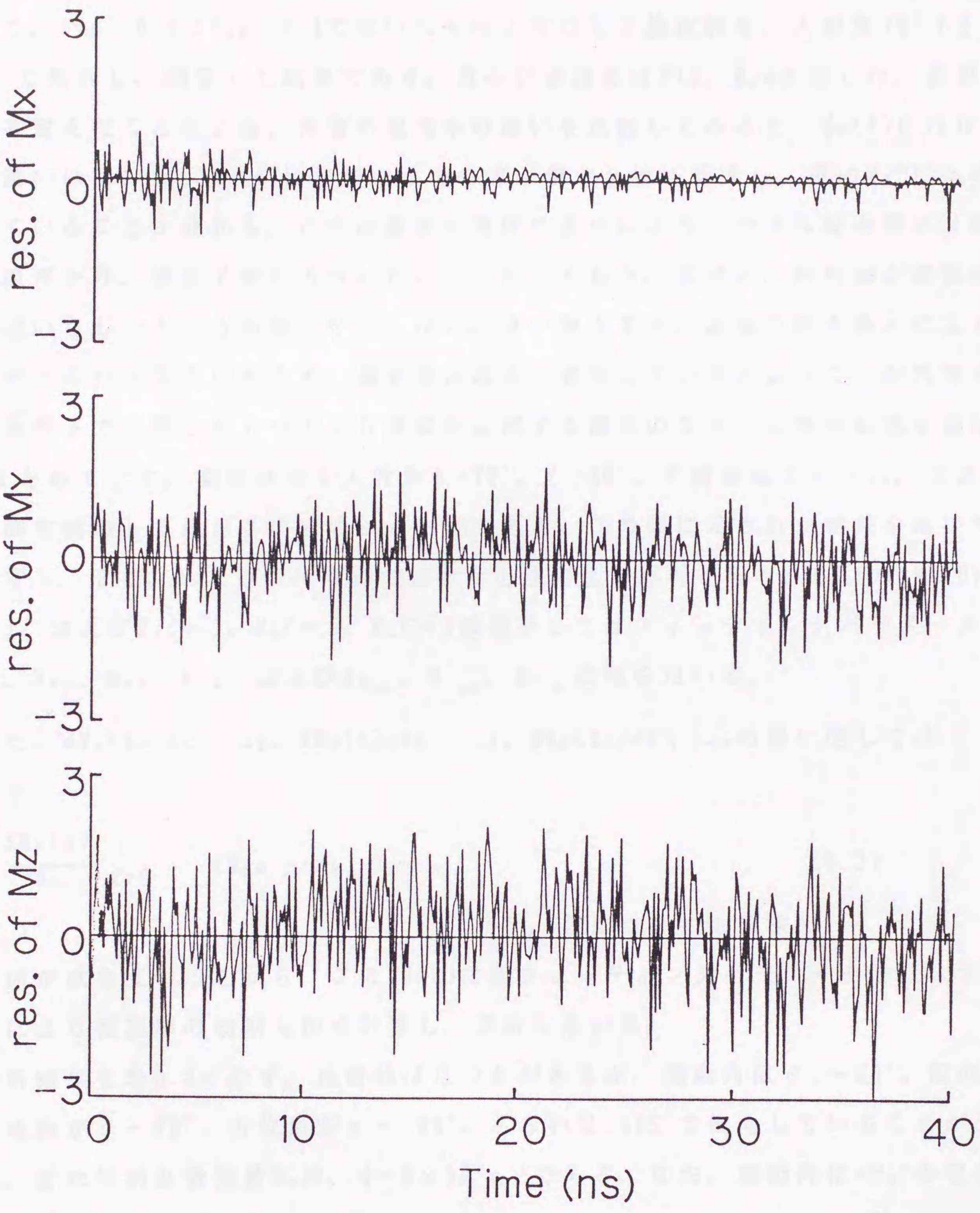


Fig. 6.2 ステアリン酸+DPHプロピオン酸(1%)LB膜の偏光率測定例の重み付き残差

分子はナノ秒のオーダーで揺動運動していることが分かる。

さて、Fig. 6.3はFig. 6.1で用いたものと同じＬＢ膜試料を、入射角70°（ξ=70°）で励起し、測定した結果である。重み付き残差はFig. 6.4に示した。基板の角度を変えたことによる、両者の偏光率の違いを比較してみると、$M_Y(t)$にはほとんど違いはないが、$M_X(t)$は後者の場合の方が値が全体に低下し、逆に$M_Z(t)$は増加していることが分かる。これは基板の角度の変化により、分子の配向軸がＸ軸から遠ざかり、逆にＺ軸に近づいたことを示しており、前述の、配向軸が基板法線に近いらしいと云う結論と矛盾しない。言い換えると、基板の置き換えによる見かけ上の分子配向の変化を、偏光率は忠実に表現していると云うことが出来る。

同条件下で作製した３つのＬＢ膜試料に関する測定のＳＡＬＳ解析結果を表6.1にまとめて示す。測定は全て入射角ξ=70°、ζ=80°、Ｙ軸励起で行った。なお前述の測定例のＬＢ膜はこの内のSample 3である。この表に示された結果を用いて、第３章３．２節、および３．３節で述べた方法による解析を行う。$M_X(0)$、$M_Y(0)$、$M_Z(0)$、および$M_X(\infty)$、$M_Y(\infty)$、$M_Z(\infty)$の値としてはフィッティングパラメータである、M_{X0}、M_{Y0}、M_{Z0}、および$M_{X\infty}$、$M_{Y\infty}$、$M_{Z\infty}$の値を用いる。

また、$dM_X(t)/dt|_{t=0}$、$dM_Y(t)/dt|_{t=0}$、$dM_Z(t)/dt|_{t=0}$の値に関しては、(6.1)より

$$\left.\frac{dM_X(t)}{dt}\right|_{t=0} = -(M_{X0} - M_{X\infty})/\sigma_X \qquad (6.2)$$

（Ｙ，Ｚについても同様）

の関係が成り立つことから、この(6.2)に各フィッティングパラメータを代入することにより偏光率の初期勾配を計算し、解析に用いる。

解析結果を表6.2に示す。比較的ばらつきがあるが、揺動角はθ_c～20°、配向角は、極角がδ～20°、方位角がγ～-35°、あるいは-145°で配向していることが分かる。また揺動拡散定数D_wは、4～5×$10^7 s^{-1}$である。なお、揺動角は$\langle P_2\rangle$の値を用いて計算を行った。

表6.2にも示した通り、$\langle P_4\rangle$はいずれも１より大きな値を取っていが、もちろん本来$P_4(\cos\theta)$の最大値は１である。また、ここに示した揺動拡散定数は$dM_X(t)/dt|_{t=0}$の値から算出したものであるが、他の$dM_Y(t)/dt|_{t=0}$あるいは$dM_Z(t)/dt|_{t=0}$の値から計算すると、これとは異なる値が得られる。　例えば、

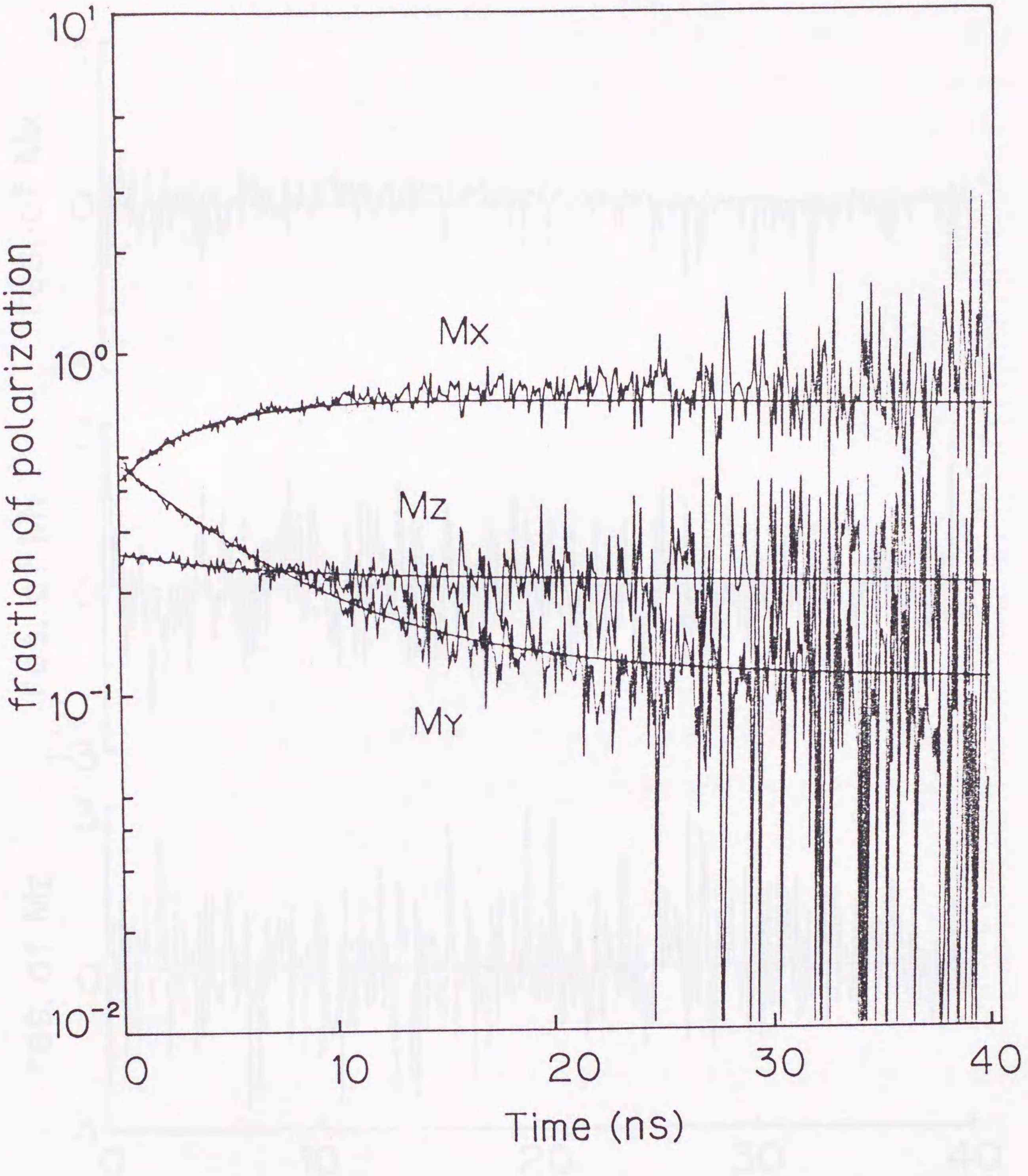


Fig. 6.3 ステアリン酸＋DPHプロピオン酸（1％）LB膜の
偏光率測定例
（基板角度：ξ＝70°，ζ＝0°　励起軸：Y軸）

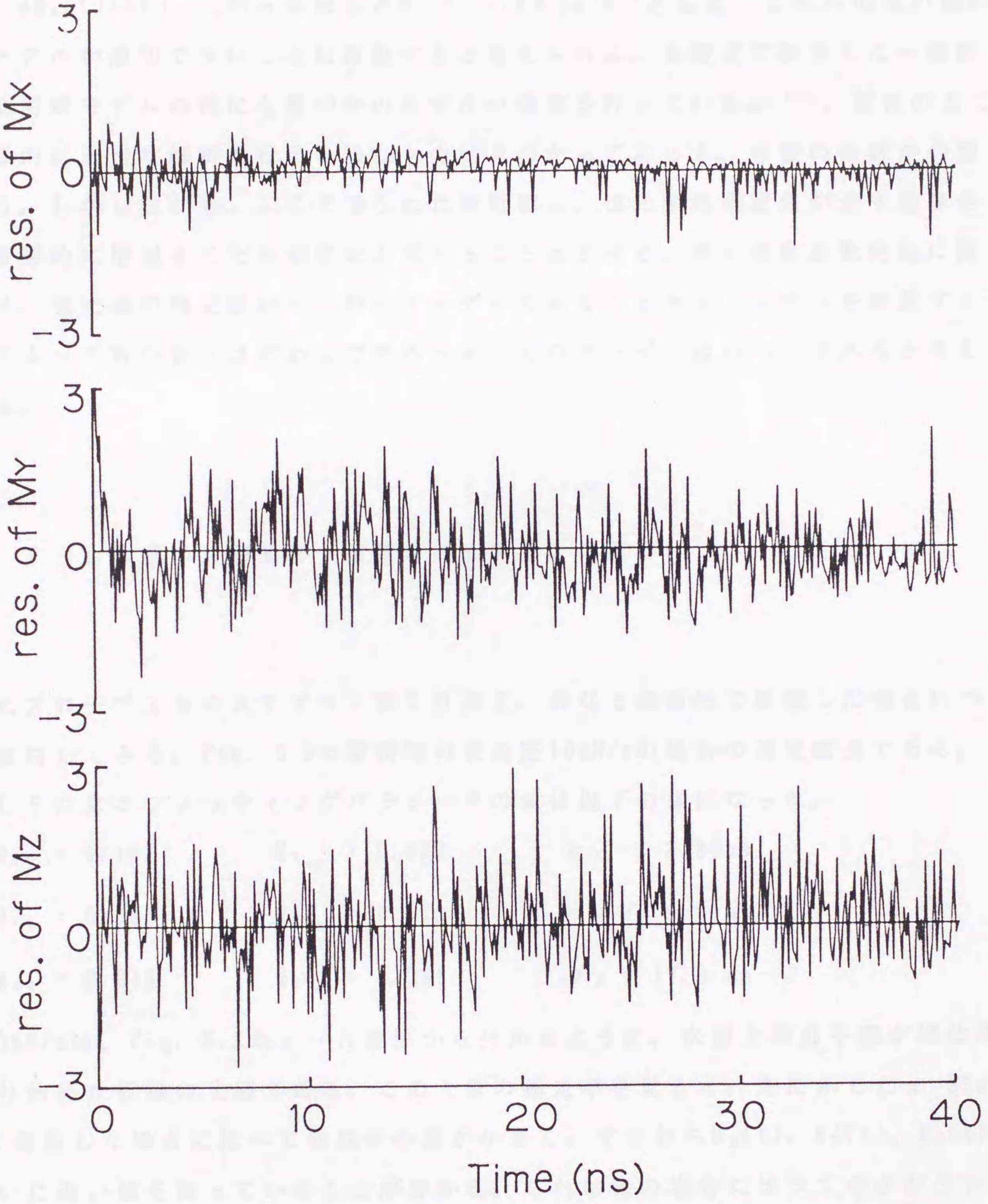


Fig.　6.4　ステアリン酸+DPHプロピオン酸（1%）LB膜の
偏光率測定例の重み付き残差

Sample3の場合、$dM_Y(t)/dt|_{t=0}$の値を用いて計算すると、$D_w = 1.9\times10^7 s^{-1}$となるが、$dM_Z(t)/dt|_{t=0}$から求めると$D_w = -4.4\times10^7 s^{-1}$となる。これらの食い違いは、モデルが適切でないことに起因すると考えられる。本論文で使用した一軸配向揺動円錐モデルの他にも幾つかのモデルの提案を行っているが[3]、現在のところ定量的に適当な解析を行える様なものは見つかっておらず、今後の検討が必要である。しかしながら、ここで得られた解析値は、偏光率の測定値が表す意味をより直感的に把握するための目安と考えることは出来る。また揺動拡散定数に関しては、偏光率の時定数がナノ秒のオーダーであることから、モデルを変更することによって有効数字は変わるであろうが、そのオーダーは$10^7 s^{-1}$であると考えられる。

6．2　ＬＢ膜の累積条件（累積時の表面圧）の影響

蛍光プローブ１％のステアリン酸ＬＢ膜を、異なる表面圧で累積した場合について検討してみる。Fig. 6.5は累積時の表面圧10mN/mの場合の測定結果である。ＳＡＬＳによるフィッティングパラメータの値は以下の様になった。

$M_{X0} = 0.192$　　$M_{X\infty} = 0.522$　　$\sigma_X = 8.80$ns

$M_{Y0} = 0.580$　　$M_{Y\infty} = 0.176$　　$\sigma_Y = 9.01$ns

$M_{Z0} = 0.246$　　$M_{Z\infty} = 0.281$　　$\sigma_Z = 17.6$ ns

π=10mN/mは、Fig. 5.3のπ－Ａ曲線から分かるように、水面上単分子膜が固体膜になり始めた直後の状態である。このときの偏光率を見ると、先に示したπ=25mN/mで累積した場合に比べて各成分の差が小さく、すなわち$M_X(t)$、$M_Y(t)$、$M_Z(t)$が互いに近い値を取っていることが分かる。これは先の場合に比べて分子がランダムに近い状態で分布していることを意味しており、膜分子の方位の揃っていない気体膜から、比較的配向秩序の高い固体膜へ推移する中間的状態にあることを反映していると考えられる。

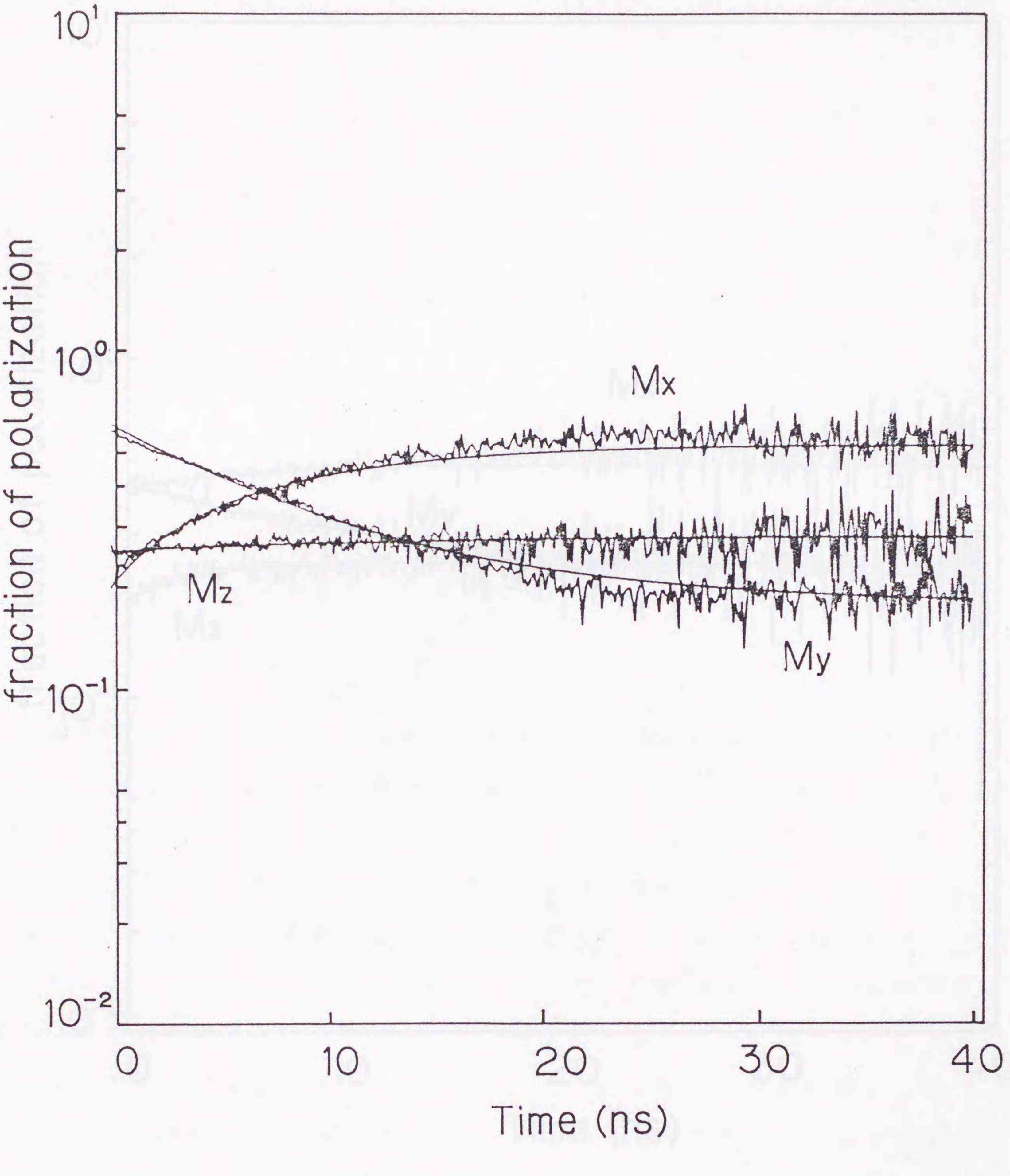
Fig. 6.6は崩壊膜の測定結果であり、ＳＡＬＳによるフィッティングパラメー

表6．1
ＤＰＨプロピオン酸を蛍光プローブとする、
ステアリン酸ＬＢ膜の偏光率測定結果

sample#	入射角 (ξ)		方向軸 X	Y	Z
1	70°	M_0	0.258	0.477	0.259
		M_∞	0.633	0.105	0.146
		σ(ns)	6.36	9.85	7.44
2	70°	M_0	0.354	0.386	0.244
		M_∞	0.637	0.096	0.200
		σ(ns)	4.61	6.97	8.64
3	70°	M_0	0.367	0.400	0.221
		M_∞	0.647	0.101	0.193
		σ(ns)	4.38	6.60	5.09
〃	80°	M_0	0.372	0.429	0.192
		M_∞	0.748	0.104	0.091
		σ(ns)	6.81	8.43	9.78

表6．2　偏光率測定データを用いた、
一軸配向円錐内揺動運動モデルによる解析結果

sample#	$\langle P_2 \rangle$	$\langle P_4 \rangle$	配向角		揺動角	揺動拡散定数
			δ	γ	θ_C	$D_W (10^7/s)$
1	0．922	2．334	21°	－34° －146°	19°	5．2
2	0．946	1．858	21°	－36° －144°	15°	4．2
3	0．892	1．383	19°	－34° －146°	22°	4．4



Ｆｉｇ． ６．５　表面圧１０ｍＮ／ｍで累積したステアリン酸
＋ＤＰＨプロピオン酸（１％）ＬＢ膜の偏光率測定結果
（基板角度：ξ＝７０°，ζ＝０°　励起軸：Ｙ軸）

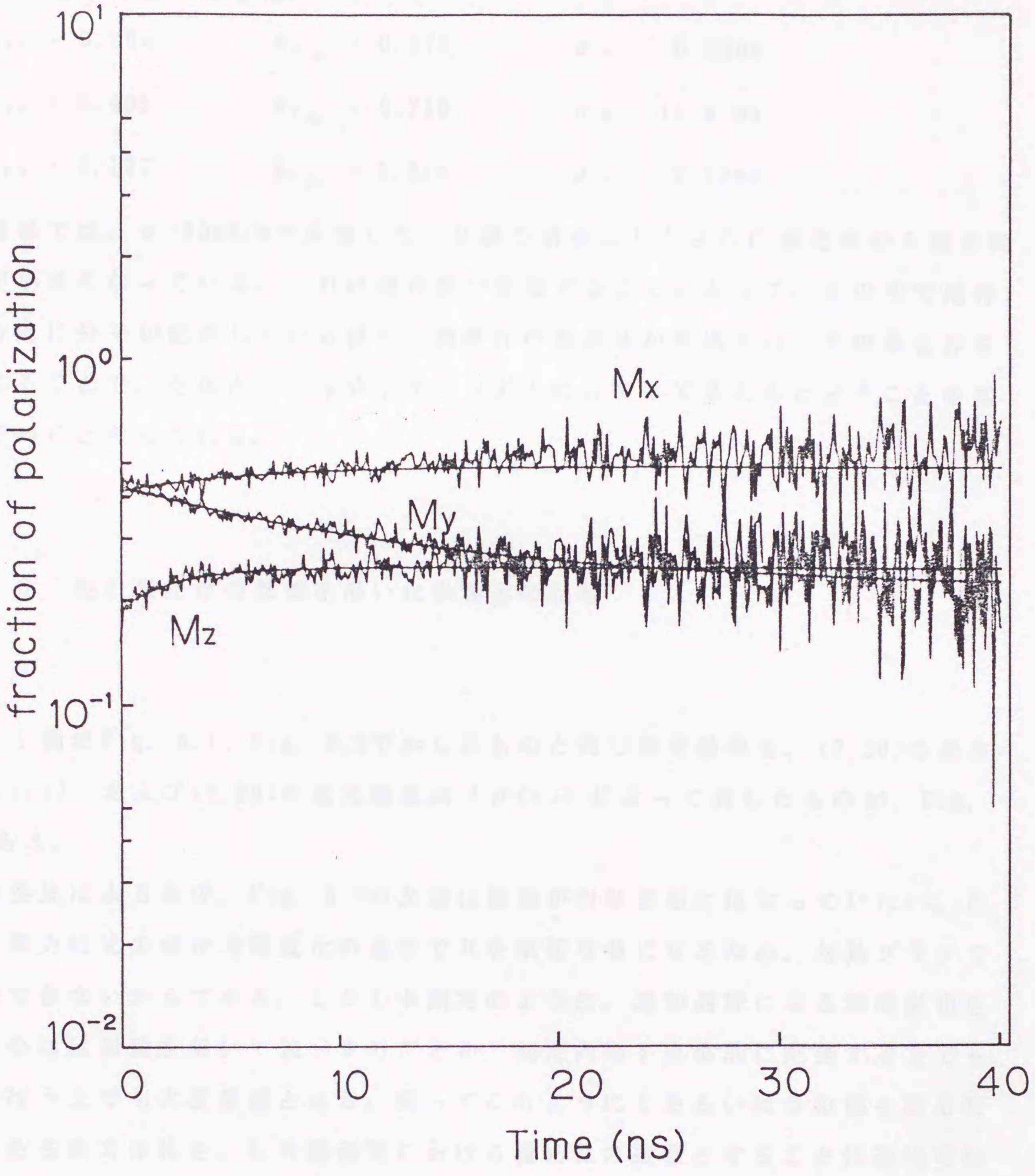


Fig. 6.6　崩壊したステアリン酸＋DPHプロピオン酸（1%）
LB膜の偏光率測定結果
（基板角度：ξ＝70°，ζ＝0°　励起軸：Y軸）

タの値は以下の様になった。

M_{X0} = 0.394　　$M_{X\infty}$ = 0.470　　σ_X = 6.32ns

M_{Y0} = 0.405　　$M_{Y\infty}$ = 0.210　　σ_Y = 12.4 ns

M_{Z0} = 0.177　　$M_{Z\infty}$ = 0.239　　σ_Z = 2.72ns

この結果では、π=10mN/mで累積したＬＢ膜の場合よりもさらに偏光率の３成分間の差が小さくなっている。これは固体膜が崩壊することによって、その中では特定の方向に分子が配向している様な、膜断片の集合体が形成され、その集合体を観測することで、全体としては分子がランダムに分布して見えると云うことを意味していると考えられる。

６．３　他の偏光性の指標を用いた表現との比較

６．１節のFig. 6.1、Fig. 6.3で示したものと同じ測定結果を、(2.20)の異方性比（r(t)）および(2.23)の蛍光強度比（ρ(t)）によって表したものが、Fig. 6.7である。

異方性比による表現、Fig. 6.7の左図は縦軸が対数表示にはなっていない。これは、異方性比の値が時間変化の途中で０を横切り負になるため、対数グラフでは表示できないからである。しかし本測定のように、緩和過程による時間変化を扱う場合には対数を用いて表示することが、測定内容を直感的に把握する上でも、解析を行う上でも大変重要となる。従ってこのように０あるいは負の値を取る可能性のある異方性比を、ＬＢ膜測定における偏光性の指標とすることは適当ではない。

また、基板の角度を変えた場合の蛍光成分の変化を反映し、異方性比、蛍光強度比共にその値が変化している。しかし前述のようにこれらの量は、配向系においてはその物理的意味が曖昧であるため、値の変化から見かけ上の分子配向分布の変化を推定することは、偏光率を用いたときと比べてかなり難しいと云える。

以上、本章で見てきたように、偏光率による時間分解蛍光偏光解消測定結果の表

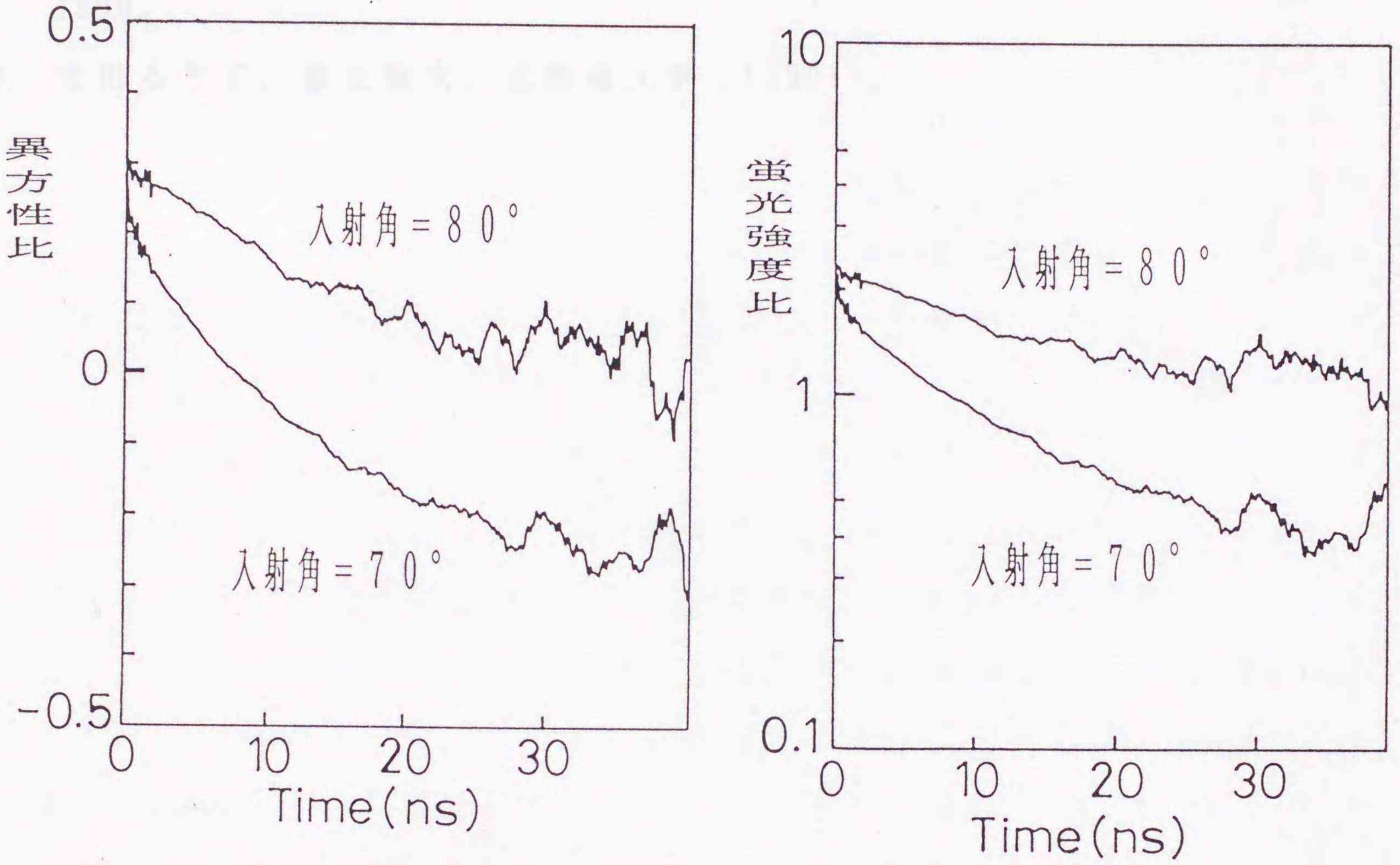
現は、極めて有効であることが確かめられた。

異方性比

$$r(t) = \frac{I_Y - I_Z}{I_Y + 2 \cdot I_Z}$$

蛍光強度比

$$\rho(t) = \frac{I_Y}{I_Z}$$



入射角＝80°

r_0 ＝ 0.30　　　　ρ_0 ＝ 2.30

r_∞ ＝ 0.05　　　　ρ_∞ ＝ 1.15

入射角＝70°

r_0 ＝ 0.28　　　　ρ_0 ＝ 2.10

r_∞ ＝ −0.25　　　　ρ_∞ ＝ 0.44

Fig. 6.7　異方性比、蛍光強度比による表現

【参考文献】

(1) 中川徹、小柳義夫、「最小二乗法による実験データ解析 プログラムＳＡＬＳ」、東京大学出版会、1982。

(2) 小柳義夫、中川徹、「ＳＡＬＳ入門 実験データの解析」、東京大学出版会、1990。

(3) 常田るり子、修士論文、北海道大学 (1991)。

第7章 結論

ＬＢ法は、次世代の電子素子となるであろう分子素子、バイオ素子開発のための重要な基盤技術である。本研究では、この方法で作製されるＬＢ膜の基礎的な構造に関して新たな視点よりアプローチを試みた。すなわち、それは膜の微視的な動的状態、つまり構成分子の揺れ動き（揺動運動）である。

この分子の揺動運動を測定する方法としては時間分解蛍光偏光解消法を用いた。これは従来、生体膜やベシクルの懸濁液のように全体として等方的な系の測定を行うための方法であった。そこで、ＬＢ膜のような平面的に配向した系を扱うためには新たな理論・測定法を作る必要があった。その際第一に問題となるのは、ＬＢ膜から発せられる蛍光の偏光の度合いを、どのような指標をもって表すかということである。従来一般的に使用されてきた異方性比は、それがもつ物理的な意味において、この場合には余り適当ではない。本論文ではこれに替わって、互いに直交する三つの蛍光偏光成分を、全蛍光強度で規格化した偏光率を用いることを論じた。まず偏光率の基本的性質、すなわちこの各成分$M_X(t)$、$M_Y(t)$、$M_Z(t)$はそれぞれ、分子がX，Y，Z各軸にどれだけ近寄って分布しているかを表していることを述べた。次に偏光率を得るための測定法、励起光に入射方向に対する基板の角度を変えて二度の測定を行う方法について記述し、さらにその結果を用いて、一軸配向円錐内揺動運動モデルの下で解析し、揺動角、配向角、揺動拡散定数を求める方法を示した。また励起分子の配向分布関数を、実数添字のルジャンドルの陪関数を使って展開し、その式を用いて偏光率の時間変化の数値計算法、および計算例について述べた。

またＤＰＨ－プロピオン酸を蛍光プローブとする、一層のステアリン酸ＬＢ膜について時間分解蛍光偏光解消測定を行った。その結果より、偏光率を指標とする表し方は直感性に優れ、他の指標を用いた場合に比べて有効であることが示された。また、累積の際の表面圧を変えてＬＢ膜の累積を行ったところ、π－Ａ曲線上で固体膜になった直後の膜は分子の配向がかなり乱雑であるが、完全な固体膜状態においては比較的分子配向が揃い、その後膜が崩壊してしまうと、再び配

向が乱れることが分かった。

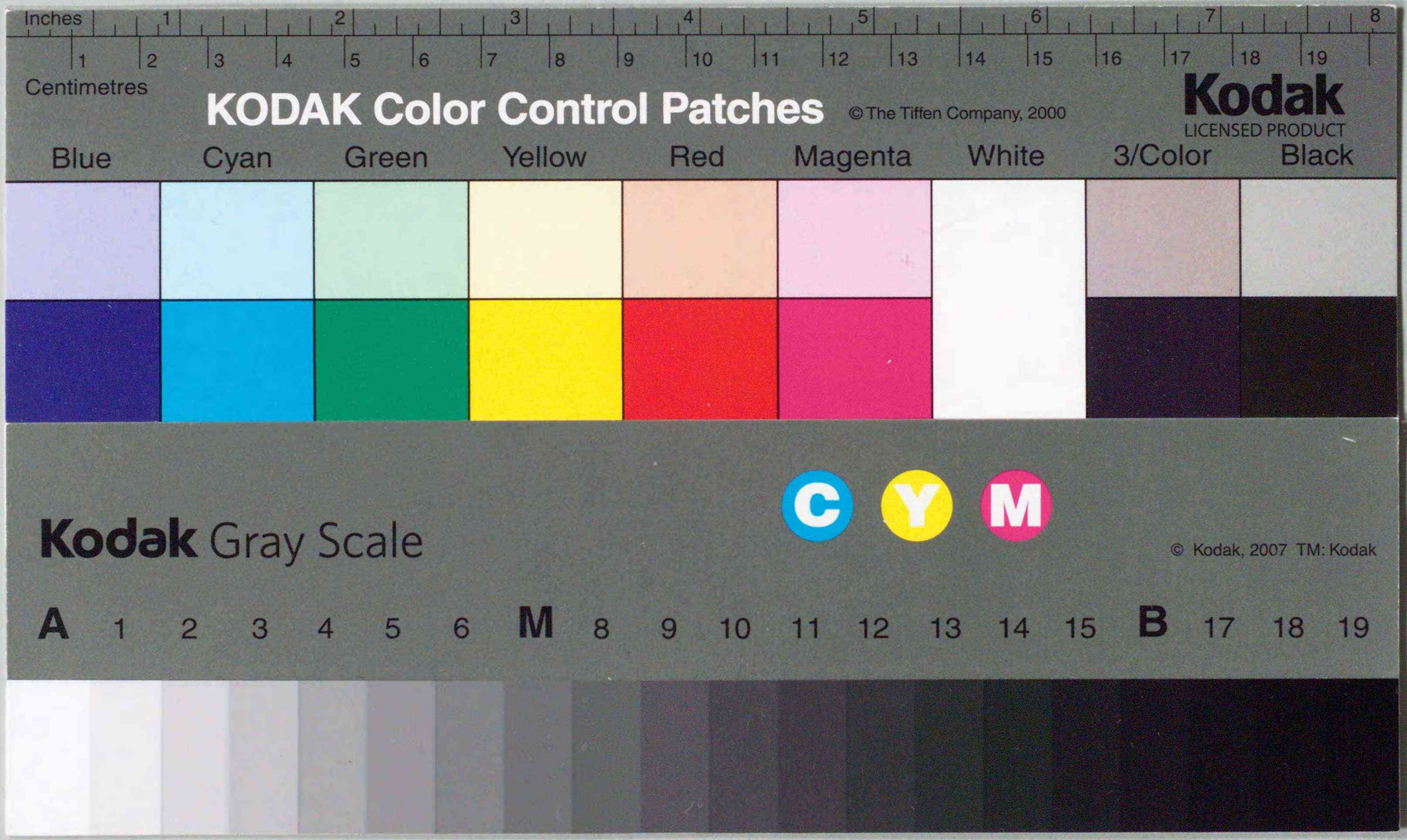
以上、本研究に依って時間分解蛍光偏光解消法を用いてＬＢ膜分子の揺動運動、配向状態を探るための基盤を確立することができたと考えられる。

謝辞

本研究の遂行に際して、終始御指導、御鞭撻を頂きました北海道大学工学部電子工学科固体電子工学講座　武笠幸一教授に深く感謝致します。また、本研究の光学測定の遂行に当たり、終始御教授を頂いた本学応用電気研究所生理部門の荒磯恒久助教授に深く感謝致します。また、本論分作成に当たり御指導を頂きました本学工学部電子工学科電子回路工学講座の小川吉彦教授、並びに同電気工学科電気応用工学講座の田頭博昭教授に感謝いたします。

さらに、共同研究者として理論、実験、数値計算の各面で協力して頂いた常田るり子氏に、ＬＢ膜研究に進むきっかけを作って下さり、日頃御教授頂きました本学工学部電子工学科固体電子工学講座　八田英嗣助手に、ＬＢ法に関するあらゆる面で御指導、御助言を頂いた鶴見大学歯学部　石井淑夫助教授に感謝致します。また、日頃御討論、御援助を頂きました北海道大学応用電気研究所生理部門の小山富康教授、金城政孝助手、神隆助手に感謝致します。実験装置の作製に関して御指導を頂きました本学応用電気研究所　新居孝技官に感謝致します。また、種々御討論、御助言を頂きました、蛸島武尚氏を始めとする（株）アドバンテスト研究所の皆様に感謝致します。

そして、当固体電子工学講座に所属して以来、日常の各面で御世話を頂きました加納美智代氏に感謝致します。最後に、日頃御討論、御助言頂いた固体電子工学講座の皆様、および本学応用電気研究所生理部門の皆様に感謝致します。


Inches
Centimetres
KODAK Color Control Patches
© The Tiffen Company, 2000
Kodak
LICENSED PRODUCT
Blue
Cyan
Green
Yellow
Red
Magenta
White
3/Color
Black
Kodak Gray Scale
C Y M
© Kodak, 2007 TM: Kodak
A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19